

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**TESIS DOCTORAL**

**Efecto sinérgico de la luz y la gravedad sobre el crecimiento y  
la proliferación celular en "Arabidopsis thaliana"**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Aránzazu Manzano Pérez**

**Directores**

**Francisco Javier Medina Díaz**

**Raúl Herranz Barranco**

**Madrid**

**Ed. electrónica 2019**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**UNIVERSIDAD  
COMPLUTENSE  
MADRID**

**Efecto sinérgico de la luz y la gravedad sobre el  
crecimiento y la proliferación celular en *Arabidopsis  
thaliana***

**Aránzazu Manzano Pérez**

Memoria Tesis Doctoral

Madrid, 2018

Bajo la dirección de los doctores:

**Francisco Javier Medina Díaz**

**Raúl Herranz Barranco**





**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



UNIVERSIDAD  
**COMPLUTENSE**  
MADRID

**Efecto sinérgico de la luz y la gravedad sobre el  
crecimiento y la proliferación celular en *Arabidopsis  
thaliana***

**Aránzazu Manzano Pérez**

Memoria Tesis Doctoral

Madrid, 2018

Bajo la dirección de los doctores:

**Francisco Javier Medina Díaz**

**Raúl Herranz Barranco**

VºBº Directores de la tesis doctoral

Dr. Francisco Javier Medina Díaz

Dr. Raúl Herranz Barranco

**Departamento de Biología Medioambiental  
Centro de Investigaciones Biológicas  
Consejo Superior de Investigaciones Científicas**





# AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer al Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC) la disponibilidad de los recursos materiales para realizar mi tesis doctoral. También a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid su soporte y flexibilidad durante todos los años de licenciatura y doctorado.

Quiero agradecer, en primer lugar, a mis directores de tesis el Dr. Francisco Javier Medina Díaz y el Dr. Raúl Herranz Barranco todo su apoyo, ayuda y confianza en mí. ¡He trabajado en la NASA! Ha sido un placer trabajar en vuestro laboratorio; dudo que en ningún otro lugar me sienta tan cómoda y a gusto. Muchas gracias.

A mis compañeros de laboratorio, Khaled, Gosia y Alicia por los buenos momentos compartidos con ellos, y a Miguel por ser mi amigo y hacerme sonreír tanto. Por supuesto, a Mercedes por su alegría y optimismo en todo momento; siempre has sido el gran apoyo de los “becarios”.

A mis compañeros del CIB: Livia, Nacho, Lourdes, Fátima, Laura, Irene, Paula, Virginia, Héctor, Mayte, Edu, Yolanda y Emanuel, por todas esas horas de risas y alegría dentro y fuera del laboratorio, además de su ayuda ante cualquier percance o problema. En especial les quiero agradecer a Meme y Alberto el haberme enseñado tan bien a trabajar en un laboratorio y a Fran por ser la persona a la que podía recurrir cuando estaba sola en el laboratorio y siempre me daba buenos consejos con una sonrisa en la cara. Siempre estaréis en mi recuerdo.

Al Dr. Francisco Tenllado por ser la primera persona en acogirme en su laboratorio y darme la oportunidad de aprender la dinámica de un laboratorio de investigación.

También quiero agradecer a todos mis nuevos compañeros de Inmunotek S. L, su gran acogida y por sus ánimos durante todos los meses de redacción de la tesis.

A mi familia, abuelos y tíos, por educarme siempre desde el cariño y el respeto. A mis padres por su apoyo incondicional, por creer siempre en mí y por el esfuerzo que les ha supuesto mis estudios y preparación. A Pablo por ser una de las personas que mejor me conoce y comprende y por supuesto, por su cariño durante todos los años que llevamos juntos. Os quiero.

A los diferentes grupos de investigación que han contribuido a la realización de esta tesis doctoral:

- Al Dr. Julio Sáez-Vásquez (CNRS-Universidad de Perpignan, Francia) y a todo su grupo de investigación por hacerme sentir como en casa y tratarme como uno más durante mi estancia en su laboratorio. Además, por su colaboración en la secuenciación masiva y el suministro de los mutantes de nucleolina y los anticuerpos anti-nucleolina.
- A la Dra. Eugénie Carnero-Díaz (Universidad Pierre et Marie Curie, París VI, Francia) por el suministro de la línea *CYCB1;1:uidA*.
- A la Dra. Verónica Pereda y a Brigitte Eche (Univesidad Paul Sabatier, Toulouse III, Francia) por el uso de la RPM de su laboratorio y todo su soporte técnico que hizo posible la realización de los experimentos presentados en este trabajo, además de su extraordinario trato personal.
- Al Dr. Jack van Loon (ESTEC-ESA) por el desarrollo y la adaptación de la RPM para hacer posible la simulación de niveles parciales de gravedad y lo más importante, confiar en nuestro grupo para llevar a cabo la validación biológica de estos nuevos modos de funcionamiento de la RPM.
- Al Dr. John Z. Kiss y al Dr. Joshua Vandenbrink por toda su ayuda, sobre todo durante el desarrollo y ejecución de la tercera fase del experimento espacial “Seedling Growth” y el suministro de los mutantes de fitocromos.
- A todo el equipo del centro de investigación Ames de la NASA, por su soporte científico-técnico que ha hecho posible la ejecución con éxito del experimento “Seedling Growth”. En especial a los Dres. Gwo-shing Sun, Marianne Steele y Elizabeth Pane por hacerme sentir integrada y tan querida durante mis estancias en California.

Por último, me gustaría dedicar este trabajo de investigación a una de las personas más importantes para mí y con la que he compartido toda mi vida, porque ella siempre será mi ejemplo a seguir y por estar siempre ahí a mi lado. Gracias *tata*.

*Este trabajo ha sido financiado por el programa de “Contratos Predoctorales para la Formación de Doctores” (BES-2013-063933) y por los proyectos de investigación otorgados por el Ministerio de Economía y Competitividad: “Plantas en la Estación Espacial Internacional. Investigaciones en el espacio y en tierra incluidas en programas de la ESA y de la NASA” (AYA2012-33982) y “Crecer plantas en el espacio. Experimentos en la Estación Espacial Internacional con liderazgo español” (ESP2015-64323-R).*

# ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>Resumen</b>	<b>1</b>
<b>Abstract</b>	<b>4</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>7</b>
<b>Nomenclatura</b>	<b>10</b>
<b>Introducción</b>	<b>12</b>
<b>1. Efecto de la gravedad y la luz en el crecimiento y desarrollo de las plantas</b>	<b>12</b>
1.1. Percepción de la gravedad	14
1.1.1. Modelo almidón-estanolito	14
1.1.2. Modelo presión del protoplasto	14
1.2. Percepción de la luz	15
1.2.1. Percepción de la luz azul y roja	15
1.2.1.1. Criptocromos	15
1.2.1.2. Fototropinas	16
1.2.1.3. Fitocromos	16
1.3. Transducción de la señal gravitropica y fototropica	17
1.3.1. Transporte de auxinas	18
1.3.2. Transducción estímulo gravitatorio	22
1.3.3. Transducción estímulo lumínico	23
<b>2. Relación entre Crecimiento y Proliferación Celular en el tejido meristemático</b>	<b>23</b>
2.1. Ciclo celular	24
2.1.1. Regulación del ciclo celular	26
2.1.1.1. Control de la transición G1/S	28
2.1.1.2. Control de la transición G2/M	29
2.1.2. Acción de las auxinas, luz y azúcares en el ciclo celular	31
2.2. Crecimiento celular	35
2.2.1. Síntesis de ribosomas y nucléolo	35
2.2.2. Proteínas nucleolares	39
2.2.2.1. Nucleolina	39
2.2.2.2. Fibrilarina	40
2.2.3. Función de la luz y de los azúcares en el crecimiento celular	41
2.3. Función de la gravedad y de la luz en el crecimiento y proliferación celular	42
<b>3. Biología de plantas en microgravedad real y simulada</b>	<b>44</b>
3.1. Experimentos previos en microgravedad real y simulada	46
3.1.1. Experimento "ROOT"	46
3.1.2. Experimentos posteriores en microgravedad simulada	48
3.1.3. Experimento "TROPI"	55
3.1.4. Experimento "Seedling Growth"	57
<b>Objetivos</b>	<b>60</b>
<b>Material y Métodos</b>	<b>66</b>
<b>1. Material biológico</b>	<b>66</b>
<b>2. Experimento "Seedling Growth"</b>	<b>68</b>
2.1. Montaje de los cassettes CC	72
2.1.1. Esterilización de las cubiertas	73
2.1.2. Preparación medio de cultivo y papel Whatman	74
2.1.3. Montado de las semillas	74
2.1.3.1. Esterilización de las semillas	74
2.1.3.2. Sembrado de las semillas	75
2.1.3.3. Posición o altura de sembrado en los cassettes	77

2.1.4. Ensamblaje de los cassettes.....	78
2.2. Optimización de los materiales, técnicas y requerimientos en el experimento espacial “Seedling Growth” ( <i>Tests</i> de laboratorio).....	79
2.2.1. <i>Tests</i> de Germinación.....	80
2.2.1.1. Propagación y chequeo de los distintos lotes de semillas .....	80
2.2.1.2. Test de Germinación SG3 .....	81
2.2.1.3. <i>Ground Germination Test</i> .....	82
2.2.2. <i>Tests</i> de fijación .....	83
2.2.2.1. Test de Fijación en placa .....	84
2.2.2.2. Test de Fijación en <i>cassette</i> .....	87
2.2.2.3. Test Fijación en FixBox-“ <i>Science Verification Test</i> ” .....	90
2.2.2.4. Test de Almacenamiento de Soluciones Fijadoras.....	94
2.2.3. “ <i>Operations and Validations Test</i> ” (OVT) de <i>Seedling Growth 3</i> .....	97
2.3. Detalles técnicos de los experimentos Espaciales SG1, SG2 y SG3.....	102
2.3.1. Seedling Growth 1 (SG1) .....	102
2.3.2. Seedling Growth 2 (SG2) .....	105
2.3.3. Seedling Growth 3 (SG3) .....	107
<b>3. Experimentos realizados en instalaciones de Simulación de Microgravedad en Tierra (Ground Based Facilities, GBF) europeas.....</b>	<b>111</b>
3.1. Modos de uso de la Random Positioning Machine (RPM) .....	111
3.2. Condiciones y diseño experimental en la RPM de ESTEC .....	115
3.3. Condiciones y diseño experimental en la RPM de Toulouse.....	116
<b>4. Técnicas de microscopía .....</b>	<b>120</b>
4.1. Análisis histoquímico de la actividad $\beta$ -glucuronidasa (GUS) en líneas transformadas .....	120
4.2. Técnicas de microscopía electrónica de transmisión .....	121
4.2.1. Preparación de las muestras .....	121
4.2.1.1. Método de Metilación-Acetilación.....	121
4.2.1.2. Método post-fijación con Tetróxido de Osmio (OsO <sub>4</sub> ) .....	122
4.2.2. Microscopía óptica sobre cortes .....	122
4.2.3. Tallado, ultramicrotomía y tinción para microscopía electrónica de transmisión.....	123
4.3. Microscopía confocal.....	123
4.3.1. Preparación de las muestras .....	123
4.3.2. Inmunofluorescencia <i>in toto</i> .....	124
4.3.2.1. Anticuerpos utilizados para la inmunofluorescencia .....	125
4.3.3. Tinción de membrana celular con Reinassance.....	125
<b>5. Técnicas transcriptómicas .....</b>	<b>126</b>
5.1. Extracción de RNA.....	126
5.2. Análisis de expresión génica por retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) .....	126
5.2.1. Tratamiento con DNasa .....	127
5.2.2. Retrotranscripción (RT).....	127
5.2.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	128
5.2.3.1. <i>Primers</i> o cebadores (RT-PCR).....	129
5.3. <i>Real-time</i> RT-PCR (RT-PCRq) en un solo paso .....	130
5.3.1. <i>Primers</i> o cebadores (RT-PCRq) .....	131
5.4. Análisis de expresión génica a nivel de genoma completo por secuenciación masiva (RNAseq).....	132
<b>6. Análisis Estadístico .....</b>	<b>134</b>

<b>Resultados</b> .....	<b>138</b>
<b>1. SEEDLING GROWTH 1-2: Análisis transcripcional (qRT-PCR) de los efectos del ambiente espacial (microgravedad real y gravedad parcial) y su recuperación por luz roja en el desarrollo temprano de <i>Arabidopsis</i> (colección fitocromos)</b> .....	<b>138</b>
1.1. Estudio morfométrico de la raíz.....	138
1.2. Análisis transcripcional (qRT-PCR).....	140
<b>2. SEEDLING GROWTH 2: Análisis transcripcional (RNAseq) de los efectos del ambiente espacial (microgravedad real) y su recuperación por luz roja en el desarrollo temprano de <i>Arabidopsis</i> (colección nucleolinas)</b> .....	<b>142</b>
2.1. Estudio morfométrico de la raíz.....	143
2.2. Análisis transcripcional (RNAseq) .....	144
2.2.1. Análisis transcriptómico global: GEDI .....	145
2.2.2. Análisis funcional: Categorías COG ( <i>Clusters of Orthologous Groups</i> ) y GO ( <i>Gene Ontology</i> ) .....	149
<b>3. SEEDLING GROWTH 3: Estudios de proliferación y crecimiento celular en el meristemo radicular de plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> en ambiente espacial (ISS y gravedad parcial) y su recuperación por luz roja (colección nucleolinas)</b> .....	<b>158</b>
3.1. Estudio morfométrico de la raíz.....	158
3.2. Estudio de la proliferación, crecimiento celular y transporte de auxinas en la raíz por técnicas de microscopía .....	160
3.2.1. Proliferación celular: nº células/unidad de longitud (mm) .....	161
3.2.2. Crecimiento celular (Área del nucléolo, $\mu\text{m}^2$ ) .....	162
3.2.3. Patrón de distribución de auxinas marcado por la línea transgénica DII-VENUS .....	164
3.2.4. Ultraestructura del nucléolo (MET).....	165
<b>4. Estudios de proliferación y crecimiento celular en el meristemo radicular de plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> sometidas a diferentes niveles de gravedad en las instalaciones de ESTEC</b> .....	<b>168</b>
4.1. Proliferación celular en condiciones de microgravedad y gravedad parcial simuladas .....	168
4.2. Expresión del gen de la ciclina B1 en condiciones de microgravedad y gravedad parcial simuladas .....	170
4.3. Crecimiento celular en condiciones de microgravedad y gravedad parcial simuladas .....	172
4.4. Variación en el crecimiento celular en un gradiente desde microgravedad hasta 1g simuladas en la RPM <sup>HW</sup> .....	174
4.5. Resumen de las variaciones en la proliferación y crecimiento celular en microgravedad y niveles parciales de gravedad simulados en oscuridad .....	177
<b>5. Estudios de proliferación y crecimiento celular en plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> sometidas a microgravedad y distintos regímenes de iluminación y radiación en las instalaciones de Toulouse</b> .....	<b>178</b>
5.1. Estudios en condiciones de microgravedad simulada y fotoperiodo .....	178
5.1.1. Crecimiento y Longitud de tallo y raíz.....	180
5.1.2. Estudio de la biogénesis de ribosomas.....	180
5.1.2.1. Biogénesis de ribosomas en la parte aérea (tallo) .....	180
5.1.2.2. Biogénesis de ribosomas en la raíz .....	184
5.1.3. Estudio de la proliferación, crecimiento celular y transporte de auxinas en la raíz por técnicas de microscopía.....	185
5.1.3.1. Proliferación celular: nº células/unidad de longitud (mm).....	185



5.1.3.2. Expresión del gen de la ciclina B1 mediante análisis histoquímico de la actividad $\beta$ -glucuronidasa (GUS).....	186
5.1.3.3. Crecimiento celular (Área del nucléolo, $\mu\text{m}^2$ ) .....	186
5.1.3.4. Patrón de distribución de auxinas marcado por la línea transgénica DII-VENUS.....	190
5.1.4. Estudio de la proliferación, crecimiento celular y transporte de auxinas en la raíz por técnicas de biología molecular.....	191
5.2. Estudios en condiciones de microgravedad simulada y oscuridad .....	193
5.2.1. Crecimiento y Longitud de tallo y raíz .....	193
5.2.2. Estudio de la biogénesis de ribosomas.....	195
5.2.2.1. Biogénesis de ribosomas en la parte aérea (tallo) .....	195
5.2.2.2. Biogénesis de ribosomas en la raíz .....	198
5.2.3. Estudio de la proliferación, crecimiento celular y transporte de auxinas en la raíz por técnicas de microscopía.....	199
5.2.3.1. Proliferación celular: nº células/unidad de longitud (mm).....	199
5.2.3.2. Expresión del gen de la ciclina B1 mediante análisis histoquímico de la actividad $\beta$ -glucuronidasa (GUS).....	200
5.2.3.3. Crecimiento celular (Área del nucléolo, $\mu\text{m}^2$ ) .....	200
5.2.3.4. Patrón de distribución de auxinas marcado por la línea transgénica DII-VENUS.....	204
5.2.4. Estudio de la proliferación, crecimiento celular y transporte de auxinas en la raíz por técnicas de biología molecular.....	205
5.3. Resumen del efecto de la microgravedad simulada en la proliferación y el crecimiento celular en distintos regímenes de iluminación, fotoperiodo y oscuridad .....	207
5.4. Estudios en condiciones de microgravedad y radiación bajo los dos regímenes de iluminación, fotoperiodo y oscuridad .....	208
5.4.1. Efecto de la radiación en condiciones control 1g y microgravedad simulada (Sim $\mu\text{g}$ RPM ) bajo estímulo lumínico (fotoperiodo) y oscuridad .....	209
5.4.1.1. Longitud de tallo y raíz.....	209
5.4.1.2. Proliferación celular: nº células/unidad de longitud (mm).....	211
5.4.1.3. Expresión del gen de la ciclina B1 mediante análisis histoquímico de la actividad $\beta$ -glucuronidasa (GUS).....	212
5.4.1.4. Crecimiento celular (Área del nucléolo, $\mu\text{m}^2$ ) .....	214
5.4.1.5. Patrón de distribución de auxinas marcado por la línea transgénica DII-VENUS.....	215

## **Discusión..... 218**

1. Alteración de la competencia meristemática en condiciones de simulación de gravedad parcial: Avances sobre los resultados del experimento espacial "Root" .....	218
2. La magnitud del vector gravedad mínima para un desarrollo normal de la planta podría estar comprendida entre 0,17g y 0,38g .....	222
3. El estímulo lumínico (fotoperiodo) atenúa los efectos causados por la microgravedad .....	224
4. La falta de sacarosa en ausencia de estímulo lumínico produce un estrés más fuerte que la falta de gravedad.....	229
5. La luz roja tiene un efecto compensador en el desajuste producido por la microgravedad en oscuridad en la competencia meristemática .....	232
5.1. Análisis por qPCR de genes marcadores seleccionados .....	232
5.2. Análisis de genoma completo por RNAseq.....	235
6. El efecto de la radiación crónica y de baja dosis es atenuado por la microgravedad simulada .....	239
7. Contribución de los resultados obtenidos a la exploración espacial.....	241

## **Conclusions..... 248**

## **Conclusiones..... 251**

## **Bibliografía ..... 256**





## Resumen

### **Efecto sinérgico de la luz y la gravedad sobre el crecimiento y la proliferación celular en *Arabidopsis thaliana***

La ausencia parcial o total de gravedad afecta al crecimiento y desarrollo de las plantas. Conocer estos efectos es muy importante porque las plantas forman una parte esencial de los Sistemas de Soporte Vital, necesarios para la futura exploración de la Luna, Marte e incluso de planetas fuera de nuestro Sistema Solar, al aportar oxígeno y alimento para los seres humanos. El crecimiento y desarrollo de las plantas son funciones vitales que se basan en la coordinación de procesos celulares como la proliferación y el crecimiento en los tejidos meristemáticos de la planta (“competencia meristemática”). La magnitud del vector gravedad en nuestro planeta ( $9,8 \text{ m/s}^2$  o  $1g$ ) ha sido constante a lo largo de la evolución de las plantas y su falta en oscuridad causa la pérdida de la competencia meristemática en la raíz, como demostró nuestro grupo en experimentos realizados en la Estación Espacial Internacional (ISS) y en simuladores de microgravedad en Tierra.

El objetivo principal de este trabajo es profundizar en los estudios previos sobre el efecto combinado del ambiente espacial (ausencia de señal gravitatoria) y la luz (señal lumínica) sobre el crecimiento y proliferación celular en la especie modelo *Arabidopsis thaliana*. En concreto, se pretende conocer en qué medida la luz puede actuar como una señal capaz de contrarrestar los efectos adversos causados por la ausencia de gravedad e incluso estimular el crecimiento y la proliferación celular, y si la radiación, en dosis equivalentes a las sufridas en el interior de la ISS y en combinación con microgravedad, puede tener un efecto pernicioso acumulativo. Además, se plantea conocer si los niveles de gravedad parcial, como los presentes en la Luna y Marte, alteran de la misma manera la competencia meristemática.

La consecución de estos objetivos ha sido posible por la realización de experimentos en la ISS dentro del marco del experimento “Seedling Growth” (SG) y otros complementarios en el simulador de microgravedad en Tierra RPM (*Random Positioning Machine*), tanto en su modo regular, como modificado (RPM<sup>HW</sup> y RPM<sup>SW</sup>), complementado con luces LEDs. Para obtener respuesta a las cuestiones planteadas se han utilizado distintas líneas de *Arabidopsis thaliana* además de la silvestre, entre las que se encuentran mutantes de las proteínas nucleolares NUC1 y NUC2 implicadas en el crecimiento celular, mutantes de los fitocromos PHYA y PHYB (fototropismo), la línea reportera de expresión de la CYCB1;1 como marcadora de proliferación y la línea DII-VENUS, reportera del patrón de distribución de auxinas, base del gravitropismo.

La proliferación y el crecimiento celular en el cilindro cortical de la raíz se han analizado midiendo el número de células por unidad de longitud en las capas meristemáticas, la expresión del gen de la ciclina B1 y el área del nucléolo marcada por inmunofluorescencia anti-fibrilarina (proteína nucleolar). A nivel molecular, la proliferación celular ha sido estudiada analizando la expresión de los genes marcadores *CYCB1;2* y *CK2A;2* y el crecimiento celular por la expresión de los marcadores *NUC1*, *NUC2* y *FIB*, así como por el análisis del procesamiento del pre-rRNA 45S por cuantificación de los rRNAs producidos en este proceso.

El estudio a nivel celular de la proliferación y el crecimiento celular en plantas sometidas a microgravedad ( $\mu g$ ), y a niveles parciales de gravedad correspondientes a los de la Luna (0,17g) y Marte (0,38g) simulados en la RPM, confirmó que la microgravedad produce un desacople entre estos dos procesos en condiciones de oscuridad. A 0,17g este desacople es más pronunciado al producirse un aumento en la tasa de proliferación y una disminución en el crecimiento más marcados que en microgravedad. En cambio, a 0,38g los valores de los parámetros indicadores de estos dos procesos son similares a los obtenidos en el control a gravedad terrestre (1g).

La incorporación de un régimen lumínico de fotoperiodo en la RPM convencional produjo la no existencia de cambios a nivel celular entre la condición experimental y la control, aun existiendo un peor procesamiento del pre-rRNA 45S y una disminución de la expresión del gen *CYCB1;2* en microgravedad. En las plantas tratadas en la RPM y

sometidas a radiación se produce un aumento en la proliferación y el crecimiento celular, alcanzando los mismos niveles que sin radiación. En cambio, en el control  $1g$  con radiación, estos dos procesos están reprimidos.

El estudio a nivel molecular del crecimiento y la proliferación celular de la línea silvestre y de los dos mutantes de fitocromos fotoestimulados con luz roja y sometidos a distintos niveles de gravedad en el experimento SG mostró que la microgravedad real altera estos dos procesos en todas las líneas, pero a medida que aumenta la magnitud del vector gravedad en la línea silvestre estas diferencias desaparecen antes que en líneas mutantes que captan deficientemente este estímulo lumínico.

Finalmente, el análisis transcriptómico de genoma completo de plantas fotoestimuladas con luz roja frente a otras mantenidas en oscuridad, crecidas en microgravedad real, mostró que las plantas fotoestimuladas poseían un menor número de genes con expresión desregulada y no implicados en la proliferación y el crecimiento celular. El estudio a nivel celular de estos dos procesos en estas plantas resultó en valores más próximos al control  $1g$  en las irradiadas con luz roja.

Las principales conclusiones obtenidas del presente trabajo son:

- El valor umbral para la percepción con normalidad del vector gravedad está comprendido entre  $0,17g$  y  $0,38g$ , siendo la gravedad presente en Marte suficiente para que se produzca un desarrollo adecuado de las plantas.
- La iluminación con un régimen de fotoperiodo es suficiente para contrarrestar significativamente los efectos causados en el crecimiento de las plantas por la falta de gravedad en oscuridad.
- La fotoestimulación con luz roja activa el crecimiento y la proliferación celular, como se demostró en las plantas crecidas en el experimento espacial “Seedling Growth”.
- La cantidad de radiación que reciben las plantas durante su crecimiento en la ISS, así como un fondo genético menos sensible, pueden atenuar los efectos producidos por el estrés gravitatorio y ser útiles para la agricultura espacial.

# Abstract

## **Synergistic effect of light and gravity on cell growth and cell proliferation in *Arabidopsis thaliana***

Lack of gravity, either totally or partially, affects plant growth and development. Understanding these effects is very important because plants are an essential part of Life Support Systems, necessary for the future exploration of the Moon, Mars and even of planets outside our Solar System, being a source of oxygen and food for the human being.

Plant growth and development are vital functions based on the coordination of cellular processes such as proliferation and growth in the plant meristematic tissues ("meristematic competence"). The gravity vector magnitude in our planet ( $9.8 \text{ m/s}^2$  or  $1g$ ) has been constant throughout the plant evolution and its lack in darkness causes the loss of the root meristematic competence, as our group demonstrated in experiments carried out in the International Space Station (ISS ) and in microgravity simulators on Earth.

The main objective of this work is to extend previous studies on the combined effect of the space environment (no gravitational cue) and light (light cue) on cell growth and cell proliferation in the model species *Arabidopsis thaliana*. Specifically, it is intended to know to what extent light can act as a signal capable of counteracting the effects caused by the lack of gravity and even stimulating cell growth and cell proliferation, and whether radiation, at doses equivalent to those existing within the ISS, together with the lack of gravity, may have an accumulative detrimental effect. In addition, we also want to know whether partial gravity levels, such as those present on the Moon and Mars, alter the meristematic competence in the same extent as microgravity does.

The achievement of these objectives has been possible by conducting experiments in the ISS within the framework of the experiment "Seedling Growth" (SG) and other complementary assays in the microgravity simulator on Earth, RPM (Random Positioning Machine), either in its regular or modified ( $\text{RPM}^{\text{HW}}$  and  $\text{RPM}^{\text{SW}}$ ) operation

mode, complemented with LED lights incorporation. To answer the questions raised, we have used different lines of *Arabidopsis thaliana* in addition to the wild type, among which mutants of the nucleolar proteins NUC1 and NUC2, involved in cell growth, mutants of phytochromes PHYA and PHYB (phototropism), the *CYCB1;1* gene expression reporter line and DII-VENUS line, as reporter of auxin distribution pattern, the basis of gravitropism.

Cell proliferation and growth in the root cortical cylinder have been analyzed by measuring the number of cells per unit length in the meristem layers, the cyclin B1 gene expression and the nucleolar area labeled by anti-fibrillarin (nucleolar protein) immunofluorescence. At the molecular level, cell proliferation has been studied by analyzing the expression of the *CYCB1;2* and *CK2A;2* marker genes and cell growth by the expression of the *NUC1*, *NUC2* and *FIB* markers and the analysis of 45S pre-rRNA processing, by quantifying the rRNAs produced in this process.

The study at the cellular level of cell proliferation and cell growth in plants subjected to microgravity ( $\mu g$ ), and to partial gravity levels corresponding to those present on the Moon ( $0.17g$ ) and on Mars ( $0.38g$ ), simulated in the RPM, confirmed that microgravity produces a decoupling between these two processes in darkness conditions. At  $0.17g$  this decoupling is more pronounced, with an increase in the proliferation rate and a decrease in cell growth more marked than in microgravity. On the other hand, at  $0.38g$  the values of the indicator parameters of these two processes do not differ from those obtained in the control of terrestrial gravity ( $1g$ ).

The incorporation of a light regime of photoperiod in the conventional RPM resulted in the absence of any change at the cellular level between the experimental condition and the control. However, 45S pre-rRNA processing showed alterations and *CYCB1;2* gene expression was decreased, in microgravity. In the plants grown in the RPM and subjected to radiation, there is an increase in cell proliferation and growth, reaching the same levels as those recorded without radiation. In contrast, in control  $1g$  with radiation, these two processes are repressed.



The study at the molecular level of the cell growth and cell proliferation in the wild-type and in the two phytochrome mutants photostimulated with red light and subjected to different gravity levels in the SG experiment showed that the real microgravity alters these two processes in all the lines, but, as the magnitude of the gravity vector increases, these differences disappear in the wild-type before than in mutant lines, which have a limited ability in the capture of this light stimulus.

Finally, the full-genome global transcriptomic analysis of red-light-photostimulated plants versus plants grown in darkness, in real microgravity, showed that photostimulated plants had a lower number of genes with deregulated expression and not involved in cell proliferation and cell growth. The study at the cellular level of these two processes in these plants resulted in values closer to the  $1g$  control in those irradiated with red light.

The main conclusions obtained from this work are:

- The threshold value for normal perception of the gravity vector is comprised between  $0.17g$  and  $0.38g$ , being the gravity present in Mars sufficient for an adequate development of plants.
- Lighting with a photoperiod regime is sufficient to significantly counteract the effects caused in the growth of plants due to the lack of gravity, in darkness.
- Photostimulation with red light activates cell growth and cell proliferation, as it was shown on plants grown in the space experiment "Seedling Growth".
- The radiation received by plants during their growth in the ISS, as well as a less sensitive genetic background, act as attenuating factors for the effects produced by gravitational stress, and may be useful for space agriculture.

# Abreviaturas

ABA: ácido abscísico  
ABC: *ATP-binding cassette*  
APC: complejo promotor de la anfase  
ARC: *Ames Research Center*. Centro de Investigaciones Ames de la NASA, California  
ARE: *auxin responsive element*. Elemento de respuesta a auxina  
ARF: *Auxin response factor*. Factor de respuesta a auxina  
ATP: Adenosina trifosfato  
AUX: *auxin transporter protein*. Proteína de transporte de auxina  
Aux/IAA: ácido-auxina/indol-3-ácido acético  
BSA: seroalbúmina bovina  
CAK: quinasa activadora de CDKs  
CC: *Culture Chamber*. Cámara de cultivo  
CCE: *CRYC-terminal extension*  
CDK: *cyclin dependent kinase*. Quinasa dependiente de ciclina  
CF: centro fibrilar  
CFD: componente fibrilar denso  
CG: componente granular  
CIB: Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid  
CIB1: *cryptochrome-interacting bHLH1*  
CK2: caseína quinasa 2  
COP1: *constitutively photomorphogenic 1*  
Cry: criptocromo  
CYC: ciclina  
DAPI: 4,6-diamino-2-fenilindol  
DMSO: dimetil sulfoxido  
DNA: *deoxyribonucleic acid*. Ácido desoxirribonucleico  
dNTP: deoxinucleósido trifosfato  
DOC: desoxicolato de sodio  
DR5: *direct repeat 5*  
DTT: ditioneítrito  
EC: *Experimental Container*. Contenedor experimental  
EMCS: *European Modular Cultivation System*. Sistema de Cultivo Modular Europeo  
ESA: *European Space Agency*. Agencia Espacial Europea  
ESTEC: *European Space Research and Technology Centre*  
ETS: *external transcribed spacer*. Espaciador transcribible externo  
FAD: *flavin adenine dinucleotide*. Dinucleótido adenina flavina  
FMN: *flavin mononucleotide*. Mononucleótido flavina  
g: gramos  
g: gravedad (como unidad se corresponde con una gravedad terrestre)  
GA: glutaraldehído  
GAF: dominio específico GMP, adenilil ciclasa y FhlA. Región de unión a cromóforo  
GAR: *Gly- and Arg-rich domain*. Región rica en glicina y arginina  
GBF: *Ground Based Facilities*. Instalaciones en Tierra (para simulación de microgravedad)  
GFP: *Green fluorescent protein*. Proteína verde fluorescente

## Abreviaturas y Nomenclatura

GLACIER: *General Laboratory Active Cryogenic ISS Experiment Refrigerator*  
GUS: proteína  $\beta$ -glucuronidasa  
HW: *hardware*  
IAA-: forma desprotonada de la auxina (activa)  
IAAH: forma protonada de la auxina (inactiva)  
ICK-KRP: proteína inhibidora de CDKs  
IgG: inmunoglobulina G  
ILSRA: *International Life Sciences Research Announcement*  
ISS: *International Space Station*. Estación Espacial Internacional  
ITS: *Internal Transcribed Spacers*. Espaciadores internos transcriptos (del rRNA)  
JA: ácido jasmónico  
KSC: *Kennedy Space Center*, Cabo Cañaveral, Florida  
LCPR: *local cell proliferation rate*. Tasa de proliferación celular  
LOV: *light, oxygen, voltage*  
M: mitosis  
MELFI: *Minus Eighty-Degree Laboratory Freezer for ISS*  
N-USOC: *Norwegian User Support and Operations Centre*. Centro de Operaciones y Soporte a Usuarios (de la ISS) en Noruega  
NASA: *National Aeronautics and Space Administration*. Agencia Espacial Estadounidense  
NOR: *Nucleolar organizer region*. Región organizadora nucleolar  
NPH3: *nonphoyotropic hipocotyl 3*  
OVT: *Operations verification test*. Ensayo de verificación de operaciones de experimentos espaciales  
PBS: *phosphate based solution*. Tampón fosfato  
PCR: reacción en cadena de la polimerasa  
PFA: paraformaldehído  
Pfr: configuración del fitocromo bajo luz roja lejana (inactiva)  
Phot: fototropina  
PHR: photolyase-homologous región  
Phy: fitocromo  
PIF: *phytochrome interacting factors*. Factores interacción fitocromos  
PIN: *Auxin efflux carrier component*. Familia proteica PIN-formed  
Pr: configuración del fitocromo bajo luz roja (activo)  
R: luz roja  
RBD: *RNA binding domain*. Región de unión al RNA  
RL = FR: *Far red*. Luz del rojo lejano  
RNA: *Ribonucleic acid*. Ácidos ribonucleicos  
ROOT: proyecto espacial para el estudio de raíces de Arabidopsis  
RPM: *Random Positioning Machine*  
rpm: revoluciones por minuto  
RPT2: *root phototropism 2*  
RRM: dominio de reconocimiento del RNA  
rRNA: RNA ribosómico  
RT-PCRq: retrotranscripción seguida de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real  
RT: retrotranscripción  
RT: *room temperature*. Temperatura ambiente  
SCF: complejo proteico SKP, Cullin, F-Box  
SDS: dodecyl sulfato sódico  
SG: *Seedling Growth*

SPAs: *suppressor of PHYA*. Supresor de PHYA

ST: *Schedule test*. Ensayo de programación de experimentos espaciales

SW: *software*

TCA: ciclo del ácido tricarboxílico

Thr: triptófano

TIR: *transport inhibitor response*

TIS: *Transcription initiation site*. Sitio de inicio de la transcripción

TOR: *target-o-rapamycin*

TROPI: *Experimento espacial “ Analysis of a novel sensory mechanism in root phototropism ”*

Try: tirosina

UV: ultravioleta

X-Glc A: 5-bromo-4-cloro-3-indolyl  $\beta$ -D-ácido glucurónico

## Nomenclatura

En el presente trabajo para denominar genes, proteínas, líneas transformadas y mutantes se ha seguido las directrices propuestas por Meinke y Koornneef (1997). (<http://www.arabidopsis.org/portals/nomenclature/guidelines.jsp>).

Las reglas seguidas más importantes son:

- Genes: designados con tres letras mayúsculas escritas en cursiva. Diferentes variantes de un mismo gen en una especie se indican con números o con una letra y un número. Los genes homólogos de diferentes especies se distinguen anteponiendo un prefijo específico (no en cursiva). Ejemplo: *NUC*, *AtNUC*, *AtNUC-L1*.
- Proteínas: designadas con la misma abreviatura que el gen que la codifica en letras mayúsculas y tipografía normal. Pueden utilizarse los nombres propios. Ejemplo: *NUC*, *AtNUC*, *AtNUC-L1*, nucleolina.
- Mutantes: indicados con el nombre del gen mutado en minúsculas y cursiva. Ejemplo: *nuc*, *Atnuc*, *Atnucl1*.
- Construcciones génicas: nombradas con los dos genes fusionados (fusión entre el promotor de un gen y la región codificante de otro) separados por dos puntos o un guión. Ejemplo: *CYCB1;1:uidA*, DII-VENUS.

# INTRODUCCIÓN

- 1. Efecto de la gravedad y la luz en el crecimiento y desarrollo de las plantas**
- 2. Relación entre Crecimiento y Proliferación Celular en el tejido meristemático**
- 3. Biología de plantas en microgravedad real y simulada**

# **Introducción**

## **1. Efecto de la gravedad y la luz en el crecimiento y desarrollo de las plantas**

Las plantas viven en ambientes dinámicos con cambios continuos y para sobrevivir y prosperar en estos ambientes han desarrollado estrategias para hacer frente a estas condiciones cambiantes de temperatura, agua, luz, etc. Debido a su naturaleza, las plantas son organismos sésiles, que no pueden escapar ante condiciones ambientales adversas. Sin embargo, sobre esta condición sésil, las plantas han desarrollado movimientos que median su crecimiento y las ayudan a adaptarse a los cambios ambientales que las rodean. Estos movimientos que condicionan la dirección y la intensidad de su crecimiento son denominados tropismos (Gilroy 2008).

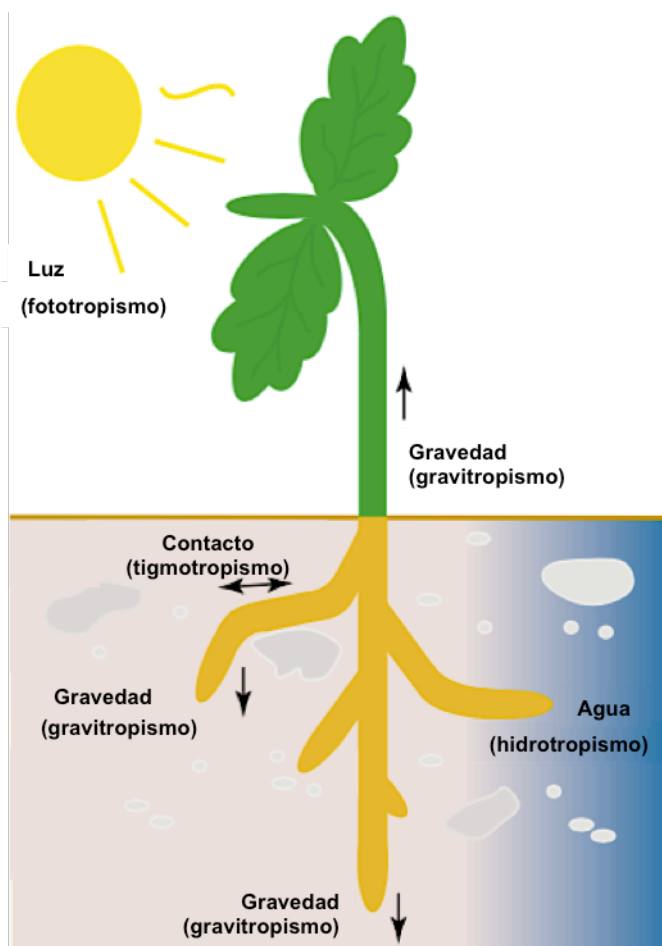
Existen varios tropismos en respuesta a varios parámetros ambientales, como son el hidrotropismo (orientación de crecimiento de la raíz hacia la fuente de agua), el quimiotropismo (orientación de crecimiento definida por una sustancia química presente en el medio) o el tigmotropismo (dirección de crecimiento dirigida por el contacto con un objeto). Pero en las plantas, la gravedad y la luz son los dos parámetros ambientales más importantes que generan tropismos que afectan a su crecimiento y desarrollo (Kiss 2007a).

La gravedad es un estímulo que ha permanecido constante (tanto en dirección como en magnitud) en la superficie de la Tierra durante el proceso completo de evolución de las plantas proporcionándolas información espacial sobre el ambiente que las rodea, lo que es imprescindible para que orienten su crecimiento en función de este estímulo (gravitropismo), de tal manera que los tallos o partes aéreas de las plantas crecen en contra de la dirección del vector gravedad (gravitropismo negativo), mientras que las raíces crecen en la misma dirección del vector gravedad (gravitropismo positivo) (Murray 2002; Hangarter 1997).

La luz, a través de la fotosíntesis es, en última instancia, la única fuente de energía para el crecimiento de las plantas. Por ello la cantidad, calidad, dirección y duración de este estímulo modula la dirección de crecimiento de las plantas (fototropismo). Las raíces crecen en dirección opuesta a la fuente de luz (fototropismo negativo), penetrando en el suelo, lo que les ayuda a anclarse y absorber agua y nutrientes, mientras que los tallos

crecen hacia la fuente de luz (fototropismo positivo o heliotropismo) lo que permite a las hojas maximizar la captación de luz (Iino 2006; Pedmale y Liscum 2007; Vandenbrink et al. 2014a) (FIGURA 1).

El desarrollo de las plantas es muy diferente en presencia o ausencia de luz. Cuando ocurre en oscuridad se denomina escotomorfogéneis o etiolación y cuando el desarrollo es, en presencia de luz, se denomina fotomorfogénesis o de-etiolación. La morfología de las plantas etioladas se diferencia de las plantas que se desarrollan en presencia de luz por sus hipocotilos más largos, sus cotiledones más pequeños y por poseer plastidios sin clorofila (etioplastos) (Molas y Kiss 2009).



**Figura 1. Principales factores ambientales que determinan la dirección de crecimiento de la planta (tropismos).** La luz, la gravedad, el agua y el contacto con otros objetos son factores abióticos que dirigen el desarrollo y crecimiento de las plantas.

Adaptado de Gilroy 2008.



## 1.1. Percepción de la gravedad

Existen dos hipótesis o modelos que explican la percepción del estímulo gravitatorio por las plantas:

### 1.1.1. Modelo almidón-estatólito

Este modelo propone que la percepción de la gravedad es mediada por la interacción de los estatólitos (amiloplastos), localizados en las capas de células de la columela o estatocitos de la punta de la raíz y en las capas de células endodérmicas del tallo, con otras estructuras citosólicas, proporcionando información direccional a la planta (Kiss 2000; Saito et al. 2005). Un cambio en la posición de la planta provoca un cambio de energía potencial en los estatólitos, que es transmitida a la membrana plasmática, debido a su nueva posición en la misma dirección del nuevo vector gravedad. Esta nueva posición es transmitida al resto de la planta por la vía de señalización de auxinas (Firn et al. 2000).

Este modelo está apoyado por experimentos realizados con mutantes deficientes en estatólitos tanto de la raíz como del tallo, en los cuales se observa un retraso o una falta de respuesta gravitrópica (Kiss y Sack 1989; Fujihira et al. 2000). Además se ha establecido que la respuesta gravitrópica está ligada a la tasa de sedimentación de los estatólitos (MacCleery y Kiss 1999) y por tanto está correlacionada con la masa total de éstos, tanto en la punta de la raíz (columela) como en el tallo (tejido endodérmico) (Kiss et al. 1997).

### 1.1.2. Modelo presión del protoplasto

Esta hipótesis sugiere que la masa total del protoplasma o citoplasma causa tensión y compresión en la parte superior e inferior de la célula por su movimiento en función de la dirección del vector gravedad. Estas pueden transmitir la señal de cambio de dirección del vector gravedad a los receptores unidos a ese tramo de membrana plasmática y desencadenar una respuesta (Wayne y Staves 1996; Wayne et al. 1990).

Este modelo se basa en los estudios realizados en dos especies de algas, *Nitellopsis* y *Chara*, las cuales no poseen orgánulos cargados de almidón (amiloplastos) que puedan sedimentar, pero responden al estímulo gravitrópico por una transmisión de la señal

dependiente del citoplasma (Staves 1997; Wayne et al. 1992). Además, este modelo también está respaldado por el hecho de que mutantes deficientes en estatolitos tienen una respuesta gravitrópica reducida, pero siguen captando y respondiendo a la gravedad (Kiss et al. 1989).

## 1.2. Percepción de la luz

Las plantas han desarrollado sistemas complejos y extremadamente sensibles que captan la luz a lo largo de todo el espectro para reaccionar correctamente a este estímulo lumínico. Las plantas tienen varias clases de fotorreceptores, que se clasifican por captar la luz ultravioleta de tipo B (UV-B), la luz ultravioleta de tipo A y luz azul (UV-A/azul) o la luz roja/roja lejana (R/RL) (Briggs y Lin 2012).

### 1.2.1. Percepción de la luz azul y roja

#### 1.2.1.1. Criptocromos

La especie modelo *Arabidopsis thaliana* posee tres criptocromos (cry1-cry3) (Christie et al. 2015) de los cuales, cry1 y cry2 median entre otras respuestas, la inhibición de la elongación del hipocotilo bajo luz azul y la iniciación floral controlada por los ritmos circadianos (Li y Yang 2007; Yu et al. 2010), pero la función fisiológica de cry3 no está todavía clara (Brudler et al. 2003; Huang et al. 2006).

Los criptocromos son flavoproteínas nucleares con dos dominios funcionales: el extremo N-terminal o región con homología a fotoliasa (PHR, *photolyase-homologous region*) que une el cromóforo FAD (*flavin adenine dinucleotide*) y el extremo C-terminal que es un dominio CCE (*CRY C-terminal extension*) (Yu et al. 2010). La luz azul cambia la conformación proteica de estos fotorreceptores al alterar su estatus de fosforilación, lo que les permite interaccionar con otras proteínas, como son CIB1 (*Cryptochrome-interacting bHLH1*), COP1 (*Constitutively photomorphogenic 1*) y SPAs (*Supressor of PHYA*), para iniciar su ruta de señalización (Yu et al. 2010, 2007).

### 1.2.1.2. Fototropinas

Las fototropinas son fotorreceptores de luz azul que median comportamientos dinámicos en las plantas, incluyendo el fototropismo en tallo y raíz, la relocalización de cloroplastos, la apertura de estomas y la expansión de cotiledones (Jarillo et al. 2001; Sakai et al. 2001; Christie 2007).

La familia de las fototropinas está formada por phot1 y phot2, ambos con dos dominios LOV (*light, oxygen, voltage*) en su extremo N-terminal que unen el cromóforo flavina o FMN (*flavin mononucleotide*) (Christie et al. 1999) y un extremo C-terminal con actividad quinasa que causa su autofosforilación en presencia de luz azul (Kaiserli et al. 2009).

Estos receptores son proteínas, localizadas en la membrana plasmática, que cuando son excitadas por la luz azul se autofosforilan, liberándose y dirigiéndose al citoplasma para iniciar su ruta de señalización de respuesta al estímulo lumínico. La fototropina phot2 se asocia al aparato de Golgi, mientras que phot1 se internaliza por endocitosis mediada por clatrina (Sakamoto 2002; Wan et al. 2008; Kong et al. 2006; Kaiserli et al. 2009).

Recientemente se han descrito varios sustratos de phot1, entre los que se encuentran: el transportador de eflujo de auxinas ABCB19 (*ATP-binding cassette B19*) (Christie et al. 2011), NPH3 (*Nonphototropic hypocotyl 3*) y RPT2 (*Root phototropism 2*) (Motchoulski y Liscum 1999; Inada et al. 2004; Pedmale y Liscum 2007).

### 1.2.1.3. Fitocromos

Los fitocromos son los fotorreceptores que captan la luz roja/roja lejana. Cinco miembros de esta familia, phyA-phyE, están codificados por el genoma nuclear de *Arabidopsis thaliana* (Briggs 2001; Clack et al. 1994).

Estos fotorreceptores son cromoproteínas que existen como dímeros y cada uno de los monómeros posee dos dominios funcionales: en el extremo N-terminal posee el sitio de unión del cromóforo o GAF y en el extremo C-terminal posee tres subdominios con capacidad reguladora para su dimerización y translocación al núcleo (Rockwell 2006a; Rockwell et al. 2006b).

Los fitocromos ciclan entre su conformación biológicamente inactiva o Pr, que absorbe luz roja ( $\lambda=660\text{nm}$ ) y su conformación activa o Pfr, que absorbe luz roja lejana

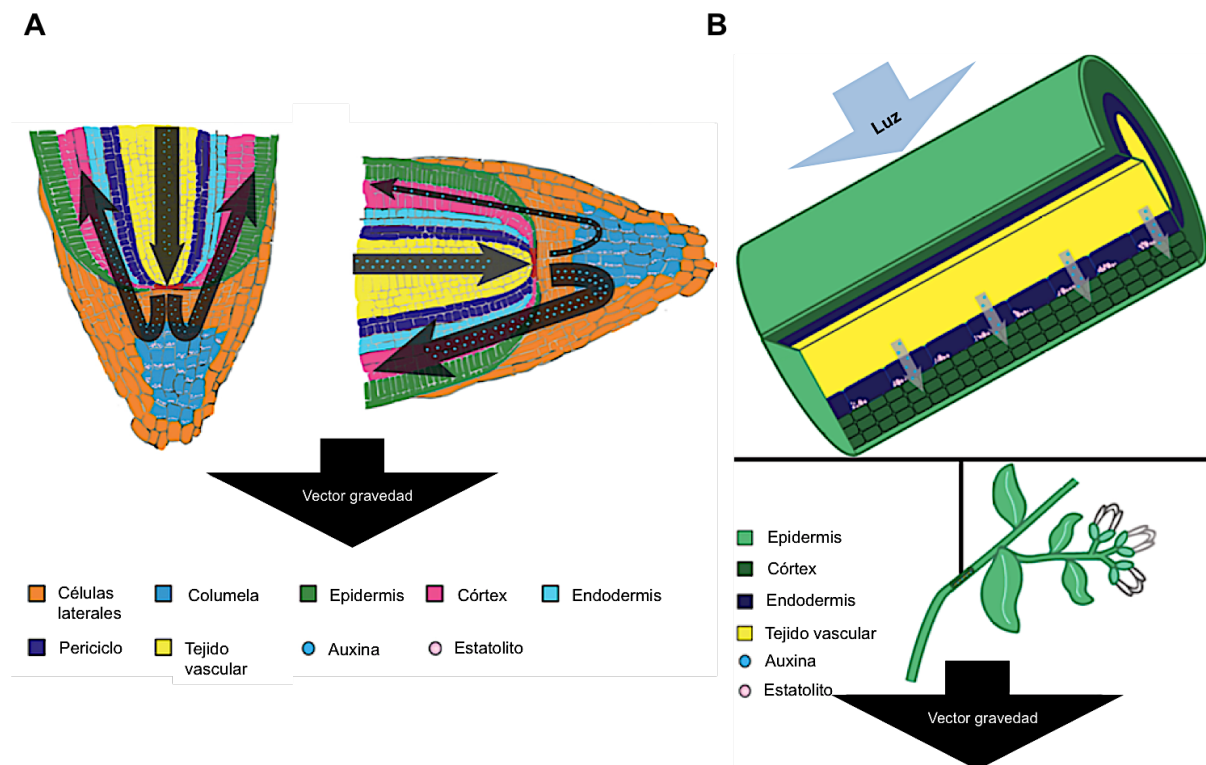
( $\lambda=730\text{nm}$ ). Ambas conformaciones son fotoconvertibles, actuando como interruptores moleculares de forma dependiente a la cantidad y calidad de la luz (Casal et al. 2014).

Entre los cinco fitocromos, phyA es el receptor de la luz roja lejana monocromática y phyB es el receptor de la luz roja monocromática (Tepperman et al. 2004).

La excitación de los fitocromos por luz roja provoca su fosforilación y posterior translocación al núcleo (Kircher 1999), donde interaccionan selectivamente con los factores de transcripción PIFs (*Phytochrome interacting factors*) conduciendo a su degradación por la vía ubiquitinación-proteosoma y permitiendo la expresión de genes dependientes del fotoestímulo rojo (Leivar y Quail 2011; Tepperman et al. 2001).

### 1.3. Transducción de la señal gravitrópica y fototrópica

Una vez captado el estímulo lumínico o un cambio en la dirección del vector gravedad, la transducción de la señal debe tener lugar para inducir el crecimiento en las zonas de elongación, tanto del tallo como de la raíz. La hipótesis de Cholodny-Went propone que este proceso se produce gracias a una distribución asimétrica de la fitohormona auxina (Went y Thimann 1937). En el caso del estímulo gravitrópico, esta hormona se acumula en la parte inferior de la raíz y el tallo, y en el caso del estímulo lumínico se acumula en la zona opuesta a la iluminada. Esta redistribución desigual de auxina, en el tallo, causa la estimulación unilateral del crecimiento celular en la zona de acumulación resultando en su curvatura hacia la luz y en contra del nuevo vector gravedad. En cambio, en la raíz la acumulación de auxina induce una inhibición en el crecimiento celular resultando en una curvatura de la raíz en la misma dirección del nuevo vector gravedad y en contra del estímulo lumínico (Ottenschlager et al. 2003; Pickard y Thimann 1963) (FIGURA 2). Esta distribución desigual de auxinas entre ambos lados de raíz y tallo está relacionada con el transporte polar de esta hormona (Christie y Murphy 2013; Hohm et al. 2013; Petrasek y Friml 2009).



**Figura 2. Transducción del estímulo gravitatorio y lumínico.** A) Un cambio en la dirección del vector gravedad (giro de 90°) hace que los estatolitos de las células de la columela (en azul) sedimenten en la nueva dirección de este vector provocando una acumulación de auxinas en el lado inferior de la raíz, lo que provoca una inhibición del crecimiento celular en este lugar resultando en una curvatura de la raíz y su reorientación en función de la gravedad. B) Un cambio en la dirección del vector gravedad hace que en las células endodérmicas del tallo se produzca la sedimentación de los estatolitos provocando el transporte lateral de auxinas, al igual que un estímulo lumínico, las cuales estimulan el crecimiento celular en su lugar de acumulación y provocan la curvatura del tallo hacia la luz y en contra de la gravedad.

Adaptado de Vandenbrink et al. 2014b.

### 1.3.1. Transporte de auxinas

El ácido indol-3-acético (IAA) es la auxina predominante en plantas y está relacionada con la regulación de varios aspectos del desarrollo de la planta. El IAA endógeno está implicado en el desarrollo embrionario y post-embrionario, en los tropismos y en la división, elongación y diferenciación celular (Teale et al. 2006).

La biosíntesis de esta fitohormona tiene lugar principalmente en tejidos jóvenes aéreos (meristemo apical) y en menor medida en el meristemo radicular de raíces primarias (Ljung et al. 2005). La auxina se sintetiza a partir de indol a través de dos rutas, una dependiente de triptófano y otra independiente de este aminoácido (Woodward y Bartel 2005).

El transporte de auxina es basipétalo desde el meristemo apical hasta la base del tallo, a partir de ahí es acropétalo hasta la punta de la raíz y una vez llega a las células de la columela, vuelve a ser basipétalo hasta la zona de elongación y diferenciación de la raíz. La auxina es transportada vía floema (vía rápida) hasta llegar a la zona del meristemo radicular, donde tanto el transporte acrópelo (cilindro cortical) como basipétalo (capas celulares más externas) ocurre célula a célula al desaparecer el tejido vascular.

El transporte de esta hormona célula a célula tiene lugar mediante transportadores de influjo (entrada) y eflujo (salida) localizados asimétricamente en la membrana plasmática, determinando así el flujo de auxinas (Rubery y Sheldrake 1973a; Rubery y Sheldrake 1974). AUX1, es un transportador de influjo de auxinas que pertenece a la familia de transportadores LAX y cataliza la entrada de IAA protonado (IAAH) al interior de la célula. Este transportador se localiza en la membrana de las células de la columela, en la capa epidérmica y cortical del meristemo radicular y en el protofloema, facilitando tanto el transporte acropétalo como basipétalo (Swarup et al. 2001; Marchant et al. 1999). La localización subcelular y asimétrica de AUX1 está regulada por la proteína del retículo endoplasmático AXR4 (Dharmasiri et al. 2006).

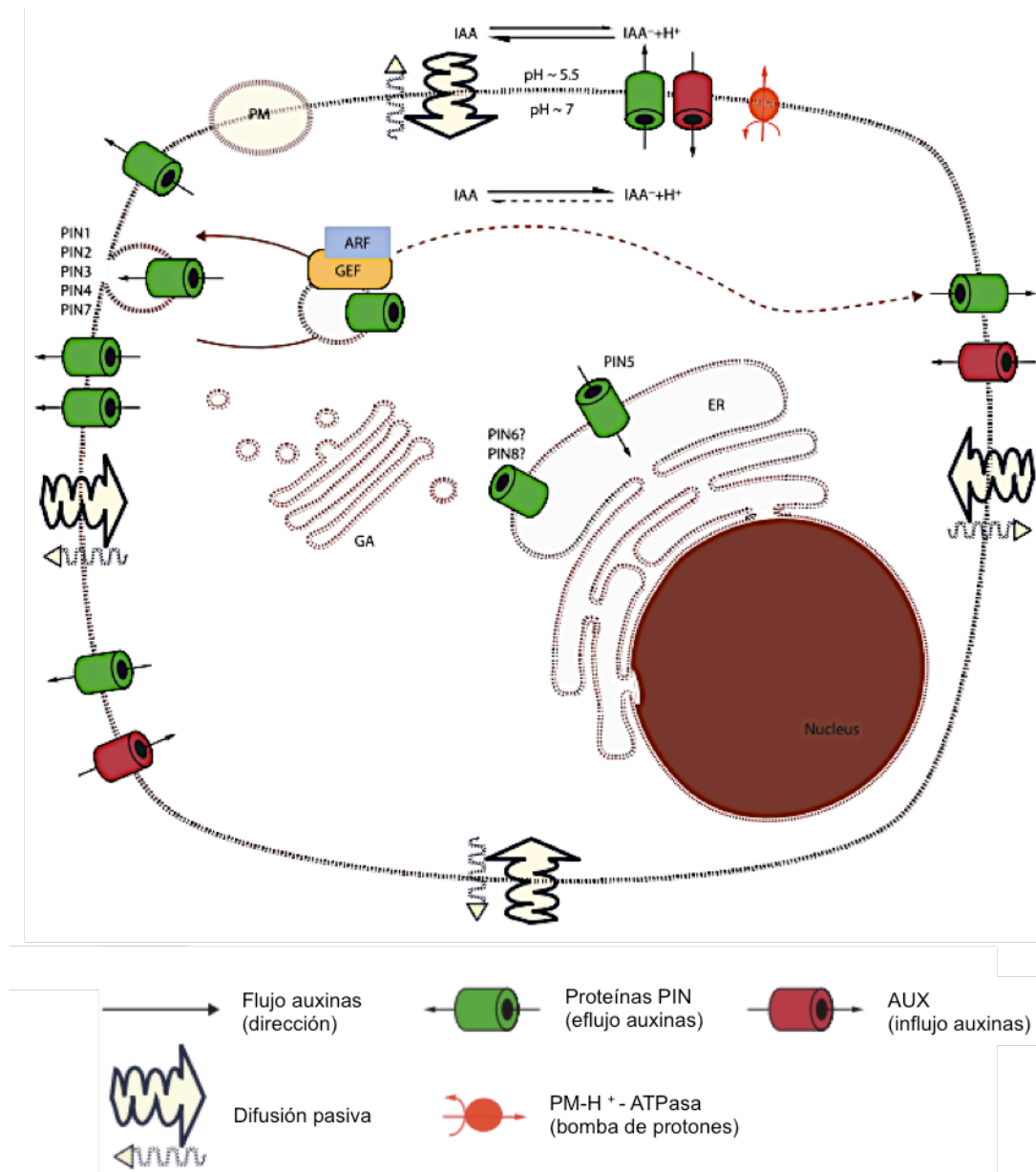
El IAA debido a sus propiedades fisicoquímicas es una molécula no cargada que a pH apoplástico ( $\text{pH} \approx 5$ ) puede difundir de forma pasiva desde el espacio extracelular al interior de la célula, en donde, debido al pH citosólico ( $\text{pH} \approx 7$ ) se disocia convirtiéndose en impermeable y dependiendo entonces de transportadores para su salida de la célula (Rubery y Sheldrake 1973b).

Las proteínas PIN (PIN-FORMED) son transportadores de eflujo de auxinas asimétricamente localizadas en la membrana plasmática o las membranas intracelulares. En *Arabidopsis thaliana*, existen 8 proteínas PIN (PIN1-PIN8) (Grunewald y Friml 2010), entre las cuales, PIN1, 2, 3, 4 y 7 están localizadas en la membrana plasmática y son componentes clave para el movimiento intercelular e intracelular de auxinas (Krecek et al. 2009). Las proteínas PIN5, 6 y 8 se localizan en el retículo endoplasmático jugando un papel en la homeostasis de esta hormona (Mravec et al. 2009; Ding et al. 2012; Dal Bosco et al. 2012).

Las proteínas PIN recirculan constantemente en vesículas a través del citoesqueleto entre la membrana plasmática y el endosoma (Geldner et al. 2001; Abas et al. 2006). Además, el transporte de auxinas coordinado por las proteína PIN requiere de su activación y control de su polaridad vía fosforilación por proteínas quinasas, entre las

## Introducción

que se encuentra la proteína PINOID, una Ser/Thr quinasa, que fosforila directamente a las proteínas PINs en su lazo hidrofílico, controlando su polaridad (Barbosa et al. 2018; Friml et al. 2004) (FIGURA 3).



**Figura 3. Localización subcelular de los transportadores de auxinas.** El transporte de auxinas célula a célula se lleva a cabo mediante proteínas transportadoras que facilitan la entrada y salida de esta fitohormona. La entrada de auxina en la célula puede producirse por difusión pasiva o mediante el transportador de influjo de auxina, AUX1 (rojo). En cambio, la salida de esta hormona depende de transportadores PIN (verde) localizados de forma asimétrica en la membrana plasmática. Los transportadores PIN1, 2, 3, 4 y 7 se localizan en la membrana plasmática participando en el transporte polar de auxina, mientras que los transportadores PIN5, 6 y 8 se localizan en la membrana del retículo endoplasmático controlando la homeostasis de esta hormona. Las proteínas PIN son polarizadas de forma muy rápida como respuesta a un estímulo (gravedad y luz) debido a que se reciclan constantemente en vesículas dependientes de clatrina entre las membranas celulares y el endosoma.

Adaptado de Krecek et al. 2009

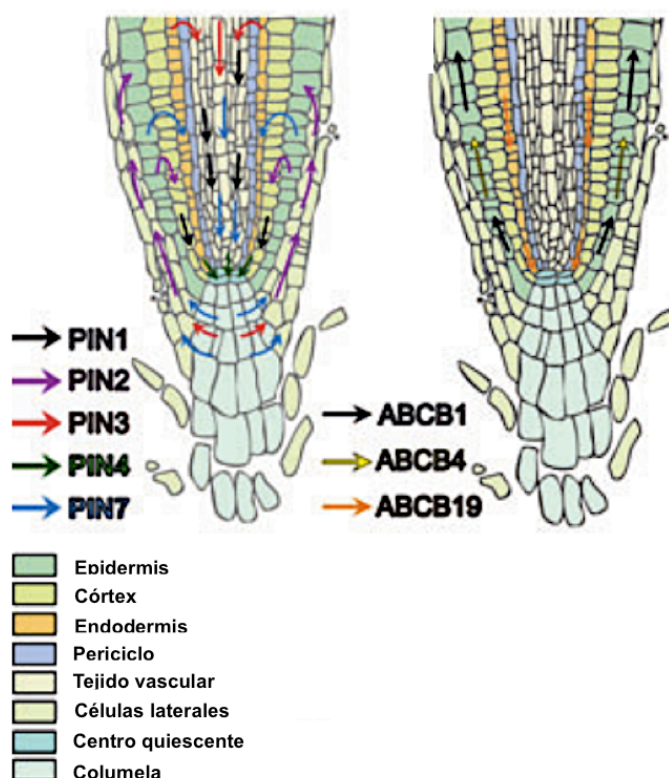
La distribución de las proteínas PIN en la punta de la raíz es la siguiente:

El transportador PIN1 se localiza en la zona basal de las células del parénquima vascular y en la estela, por lo que su función está relacionada con el transporte acropétalo (Gälweiler et al. 1998; Friml y Palme 2002).

PIN2 se localiza en la zona apical de las células que forman la epidermis y en la zona basal de las células que forman el córtex, participando tanto en el transporte basipétalo como acropétalo (Müller et al. 1998).

PIN3 se expresa uniformemente en las células de la columela, en la zona basal en las células vasculares y en el lateral de las células del periciclo de la zona de elongación (Friml et al. 2002a). PIN4 es detectado en el centro quiescente y basalmente en las células provasculares (Friml et al. 2002b). Por último, PIN7 se sitúa lateralmente y basalmente en las células provasculares del meristemo y la zona de elongación y colocaliza con PIN3 en la columela (Blilou et al. 2005) (FIGURA 4).

Las proteínas ABCB, son un tercer tipo de transportadores de auxinas, que pertenecen a la superfamilia “ATP-binding cassette” (ABC). Estos transportadores están uniformemente distribuidos en la membrana plasmática y membranas de orgánulos y su función es evitar el reflujo de auxinas en las células meristemáticas con un alto contenido en esta hormona (Wang et al. 2013; Geisler y Murphy 2006) (FIGURA 4).



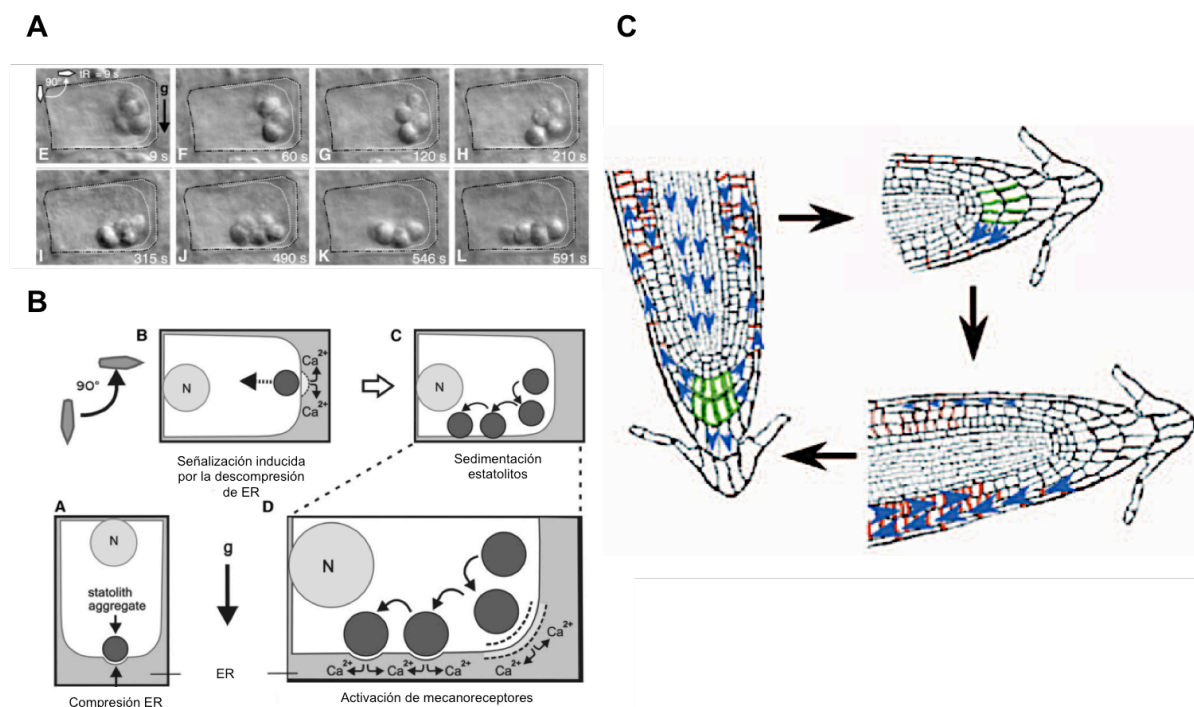
**Figura 4. Transportadores de eflujo (salida) de auxinas.** Localización de los transportadores PIN y ABCB en el meristemo radicular y su contribución en el transporte acropétalo (tallo-raíz) y basipétalo (raíz-tallo).

Adaptado de Geisler et al 2013.



### 1.3.2. Transducción estímulo gravitatorio

Los estatolitos al sedimentar debido a un cambio en la dirección del vector gravedad contactan con el retículo endoplasmático deformando su membrana y activando localmente sus canales iónicos liberándose  $\text{Ca}^{2+}$  al citoplasma. (Perbal y Driss-Ecole 2003; Leitz et al. 2009). Este aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  citósolico provoca la relocalización de PIN3 en la nueva posición basal de las células de la columela o en las células endodérmicas del tallo, aumentando los niveles de auxina en la parte inferior de la raíz o tallo (Friml et al. 2002b). Esta acumulación de auxina afecta a la distribución de PIN2 en la punta de la raíz, la cual es retenida en la membrana plasmática del lado inferior de la raíz e internalizada y degradada en el lado superior de la raíz, promoviendo y manteniendo el flujo diferencial de auxinas (Abas et al. 2006) (FIGURA 5).



**Figura 5. Relocalización de los transportadores PIN tras la captación del estímulo gravitatorio.** A) Imágenes microscópicas de la sedimentación de los estatolitos en el interior de la células con el tiempo tras un cambio en la dirección del vector gravedad. B) Esquema mostrando como la nueva posición basal de los estatolitos comprime la membrana del retículo endoplasmático liberándose el  $\text{Ca}^{2+}$  almacenado en este orgánulo al citoplasma. C) El aumento citosólico del ión  $\text{Ca}^{2+}$  provoca la relocalización de PIN3 (verde) y PIN2 (rojo) provocando una distribución desigual de auxina en la punta de la raíz.

Adaptado de Abas et al. 2006 y Leitz et al. 2009.

### 1.3.3. Transducción estímulo lumínico

La fosforilación e internalización del fotorreceptor phot1 es requerida para la respuesta fototrópica, como muestra el crecimiento aleatorio de los mutantes deficientes en esta proteína, aunque su señal de transducción no está todavía clara (Galen et al. 2007).

Los fitocromos phyA y phyB promueven el fototropismo positivo hacia la luz roja y phyA inhibe el fototropismo negativo de la raíz inducido por la luz azul en *Arabidopsis thaliana* (Kiss et al. 2003a, 2003b).

Al igual que en la respuesta gravitrópica las proteínas PIN tienen un papel significativo en el eflujo de auxinas durante la respuesta fototrópica, siendo funcionalmente PIN1 y PIN2 los principales transportadores (Christie y Murphy 2013; Christie et al. 2011; Ding et al. 2011).

La familia de transportadores ABCB también ha sido implicada en la respuesta fototrópica. En concreto, ABCB19 facilita el transporte de auxinas porque estabiliza a PIN1 en la membrana plasmática. Una pérdida de función en ABCB19 resulta en una disminución del transporte lateral de auxinas por la desestabilización de PIN1 reduciéndose la respuesta fototrópica (Kumar et al. 2011; Noh et al. 2003).

## 2. Relación entre Crecimiento y Proliferación Celular en el tejido meristemático

Los procesos de crecimiento, diferenciación y desarrollo afectan a la planta completa, pero éstos dependen de mecanismos celulares y principalmente, del crecimiento y la proliferación celular. En concreto, el tejido meristemático es la fuente de células para el crecimiento y la diferenciación, siendo finalmente la base celular para establecer el patrón de desarrollo de la planta (Scheres et al. 2002). Las células que componen este tejido tienen la capacidad de dividirse respondiendo a señales de crecimiento sin diferenciarse, lo que se denomina “competencia meristemática”. Para que esto sea así, en estas células, el crecimiento y la proliferación celular están íntimamente coordinados (Heidstra y Sabatini 2014; Mizukami 2001).

En última instancia, el desarrollo de la planta o la formación de órganos depende de la coordinación de estos dos procesos, los cuales responden a promotores de crecimiento (Di Laurenzio et al. 1996), de tal manera, que cuando estos promotores están activados

coordinan el crecimiento y la proliferación celular, manteniendo la competencia meristemática. En cambio, cuando estos promotores son reprimidos, las células pierden la competencia meristemática, desacoplándose el crecimiento y la proliferación celular, y activándose la diferenciación celular (Mizukami 2001).

El meristemo radicular de *Arabidopsis thaliana*, aunque de tamaño variable en función del tiempo de crecimiento de la planta, incluye al fragmento entre 300 y 700  $\mu\text{m}$  a partir de la punta de la raíz. Este meristemo radicular está formado por tres capas de células, (cilindro cortical) con alta tasa de proliferación que serán los futuros epidermis, córtex y endodermis. Además, hay experimentos que demuestran que el crecimiento de la raíz se debe mayoritariamente al incremento en el número de células y no a la elongación (diferenciación) de éstas (Beemster y Baskin 1998; Scheres et al. 2002) (FIGURA 6).

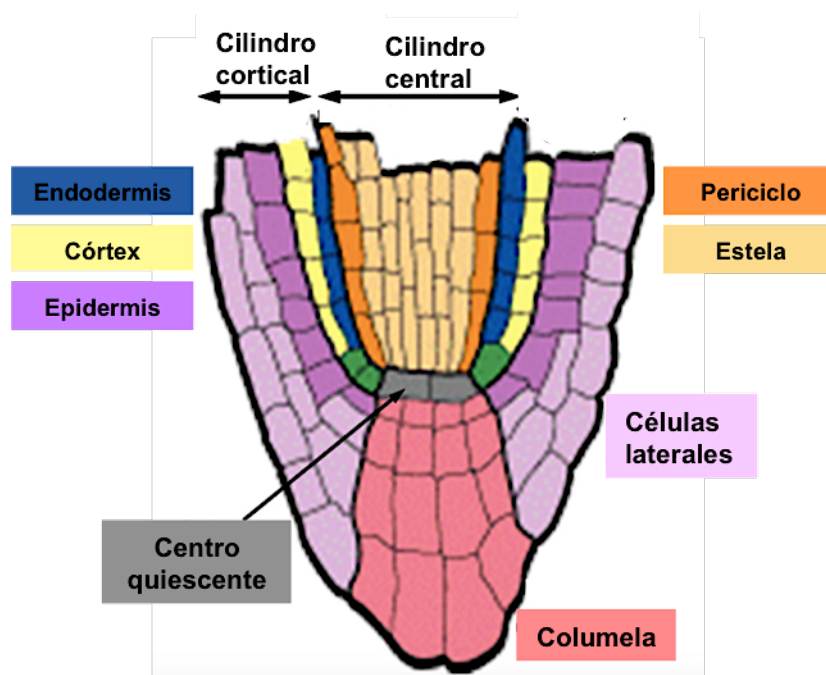


Figura 6. Sección longitudinal del extremo de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. El tejido meristemático está constituido por tres líneas de células que formarán los futuros: Endodermis (azul), Córtex (amarillo) y Epidermis (Morado).

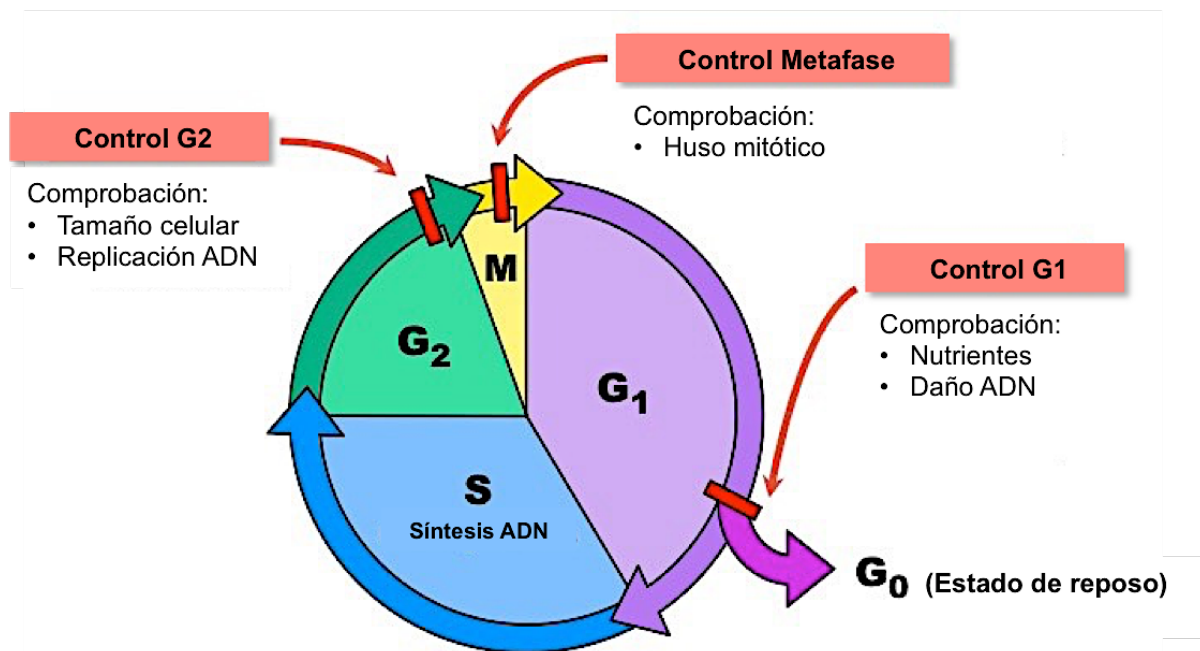
## 2.1. Ciclo celular

El ciclo celular es el conjunto de procesos que ocurren desde el nacimiento de una célula hasta su posterior división en dos células hijas. Estos procesos tienen lugar de forma secuencial y unidireccional para asegurar la correcta duplicación de la célula (Del Pozo et al. 2005).

El ciclo celular se divide en cuatro etapas sucesivas, G1, S, G2 y M. La fase G1 (*gap 1*) se caracteriza por ser una fase de crecimiento celular con síntesis de proteínas y de ARN.

La fase S es en la que tiene lugar la replicación del contenido génico (ADN). La fase G2 (*gap 2*) es otra fase de crecimiento celular en la que comienza la reorganización del citoesqueleto y se diferencia de la fase G1 en que la célula posee el doble de contenido en DNA o dotación genética. Por último, en la fase M o mitosis ocurre la segregación de los cromosomas en dos células hijas (Dewitte y Murray 2003; Francis 2007; Inzé y De Veylder 2006).

El ciclo celular está regulado en múltiples puntos, pero las transiciones G1/S y G2/M son los principales puntos de chequeo al permitir operaciones de control que aseguren que las fases previas han sido completadas con éxito y además corresponden con los puntos de potencial parada del ciclo celular como consecuencia de la evaluación de las condiciones externas. También existe un punto de control de la integridad del ADN durante la fase S y otro en la mitosis entre la metafase y la anafase (Dewitte y Murray 2003; Inzé y De Veylder 2006; De Veylder et al. 2007) (FIGURA 7).



**Figura 7. Ciclo celular.** Representación esquemática de las cuatro fases del ciclo celular (G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> y M) indicando los puntos de control (transición G<sub>1</sub>/S, transición G<sub>2</sub>/M y anafase) que tienen lugar durante su desarrollo.

### 2.1.1. Regulación del ciclo celular

La regulación del ciclo celular implica la activación secuencial, durante la progresión a través de las diferentes fases del ciclo, de una clase de proteína-quinasa de serina-treonina que requieren para su actividad y, como primer mecanismo de regulación, de la unión de una proteína reguladora (ciclina, CYC), por lo que reciben el nombre de quinasas dependientes de ciclinas (CDKs).

La mayoría de las ciclinas poseen una región conservada de 100 aminoácidos responsable de su interacción con las CDK. En *Arabidopsis thaliana* existen al menos 32 ciclinas con un papel en la progresión del ciclo celular, las cuales se clasifican en 5 tipos: A, B, C, D y H (Wang et al. 2004; Vandepoele et al. 2002; Renaudin et al. 1996). Las de mayor importancia en la regulación del ciclo son las ciclinas de tipo A (CYCA) que aparecen al comienzo de la fase S al estar implicadas en la progresión de esta fase y son destruidas cerca de la transición G2/M, las ciclinas de tipo B (CYCB), que aparecen durante la fase G2, controlan la transición G2/M y son destruidas al entrar en anafase, y las ciclinas de tipo D (CYCD), que controlan la progresión a través de G1 y la entrada en fase S (Mironov et al. 1999; Potuschak y Doerner 2001).

Los niveles de ciclinas varían con el ciclo y están estrictamente regulados tanto a nivel transcripcional como por mecanismos de degradación de proteínas. Las ciclinas de tipo A y B poseen una “caja de destrucción” que las marca para su degradación por el complejo promotor de la anafase durante la mitosis temprana y media (Genschik et al. 1998). En cambio, las ciclinas de tipo D se conjugan con ubiquitina por el complejo SCF siendo entonces, objeto de degradación por el proteosoma. Además, la presencia de este último tipo de ciclinas depende de señales extracelulares que estimulan o mantienen la división celular (Dewitte y Murray 2003).

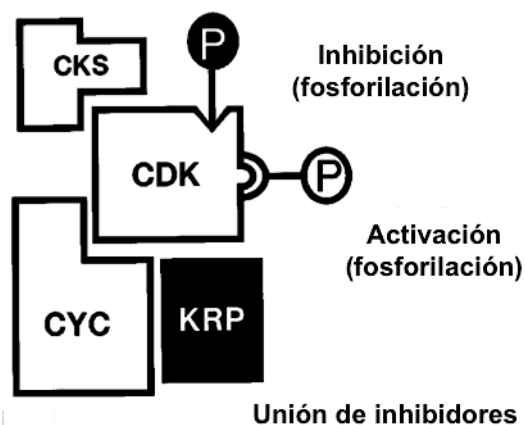
Las CDKs son proteínas muy conservadas en eucariotas, existiendo en plantas siete clases, nombradas de la A a la G, de las cuales las de tipo A, B, D, y F están ligadas a mecanismos de regulación del ciclo celular (Francis 2007). Las mejor documentadas en cuanto a su función son las CDKA y CDKB. En *Arabidopsis* hay un único gen para la CDKA, la cual posee un motivo de unión a ciclinas, denominado PSTAIRE; sus niveles son constantes a lo largo del ciclo y juega un papel esencial en las transiciones G1/S y G2/M. Las CDKB son únicas de plantas y en *Arabidopsis* hay dos familias o subgrupos, CDKB1 y CDKB2. El subgrupo CDKB1 posee el motivo PPTALRE y sus transcritos se

acumulan durante la fase S, G2 y M. El subgrupo CDKB2 posee el motivo PPTTLRE y su expresión es específica de las fases G2 y M (Serges et al. 1996; Sorrell et al. 2001; Magyar et al. 1997).

La actividad de las CDKs es regulada por fosforilación. La fosforilación, llevada a cabo por las quinasas activadoras de CDKs o CAKs del residuo de treonina, Thr160, en su “T-loop”, provoca un cambio en su conformación que permite la unión del sustrato y el acceso del grupo fosfato. En cambio, la fosforilación de los residuos Thr14 y Tyr15 en su extremo N-terminal, por la quinasa WEE1 provoca su inhibición (Sorrell et al. 2002; Vandepoele et al. 2002; Umeda et al. 1998).

Además, las CDKs también pueden ser inhibidas por las proteínas ICK-KRP (inhibidores de CDKs) al unirse a las CDKs y ciclinas por la secuencia conservada de 31 aminoácidos de su extremo C-terminal (De Veylder et al. 2001; Lui et al. 2000; Schnittger et al. 2003) (FIGURA 8).

Las CDKs activas fosforilan a distintos sustratos implicados en la regulación del ciclo celular, como son la histona H1 de los cromosomas mitóticos y componentes del citoesqueleto y del retinoblastoma (Rb), cuya fosforilación regula la transición G1/S. Además, pueden mediar la destrucción de componentes específicos del ciclo celular implicados en etapas anteriores por la vía ubiquitina-proteosoma (Dewitte y Murray 2003).



**Figura 8. Regulación de las quinasas dependientes de ciclina, CDKs.** Las CDKs son quinasas que permanecen inactivas hasta que se produce la unión de la ciclina correspondiente y es fosforilada por CAK. Su inactivación se produce por fosforilación por la quinasa WEE1 y por las proteínas inhibidoras KRPs. Además también se muestra la unión de la subunidad CKS que interacciona con los sustratos diana.

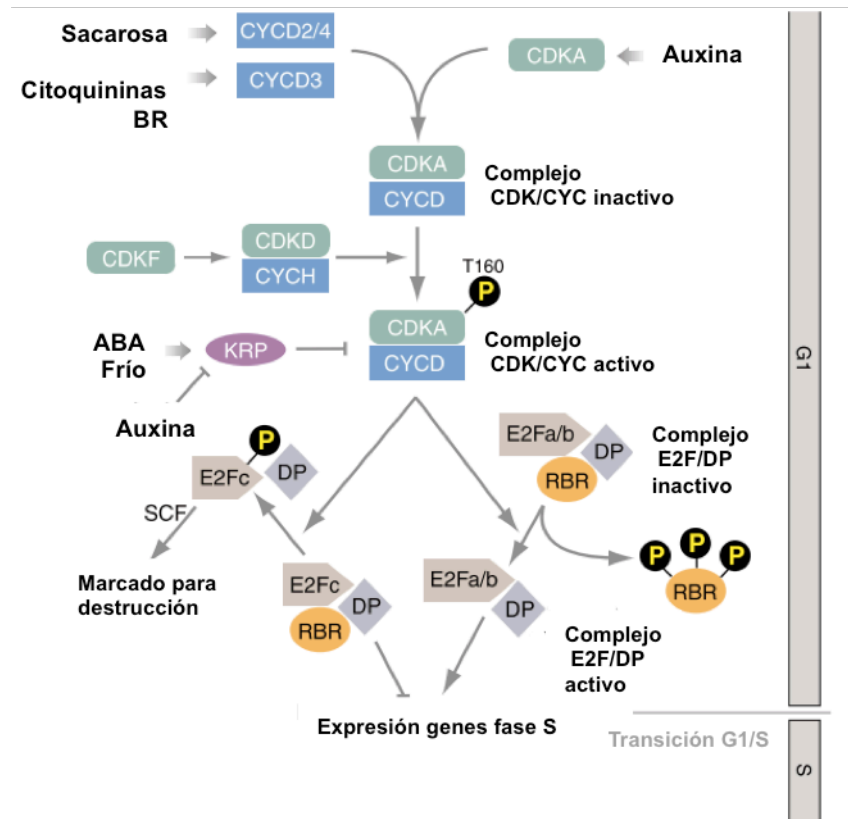
Adaptado de Dewitte y Murray 2003

### 2.1.1.1. Control de la transición G1/S

En presencia de factores de crecimiento que estimulan la división celular, como son la sacarosa, las auxinas, las citoquininas y los brasinoesteroides, se sintetizan ciclinas de tipo D que se asocian con su correspondiente CDK de tipo A, formando un complejo CDKA/CYCD. Este complejo es activado por su fosforilación vía CAK, implicando a CDKF y el complejo CDKD/CYCH, lo que permite la fosforilación del complejo represor transcripcional E2Fc/DP/RBR, conduciendo a su degradación por el complejo SCF-E3 ligasa y la fosforilación de los complejos E2Fa-b/DP/RBR provocando su liberación, de lo cual resulta la expresión de genes implicados en la replicación del ADN, la progresión del ciclo celular y la dinámica de la cromatina.

En cambio, en condiciones desfavorables de crecimiento como es la presencia de ácido abscísico (ABA) o frío, el complejo CDKA/CYCD es inhibido por KRP, impidiendo la progresión del ciclo celular (Inzé y De Veylder 2006; Boniotti y Gutierrez 2001; Nakagami et al. 2002) ([FIGURA 9](#)).

En *Arabidopsis thaliana* solo existe una proteína RBR (Dewitte y Murray 2003), pero tres factores de transcripción E2F, de los cuales E2Fa y E2Fb actúan como activadores transcripcionales y reguladores positivos del ciclo celular (De Veylder et al. 2002; Sozzani 2006; Magyar et al. 2005), y E2Fc actúa como un represor transcripcional y por lo tanto, como supresor de la división celular (Del Pozo et al. 2002; Vandepoele et al. 2005).



**Figura 9. Transición G1/S.** Bajo condiciones favorables de crecimiento el complejo CDKA/CYC es activado por CAK pudiendo fosforilar los complejos E2F/DP/RBR lo que permite la expresión de genes de la fase S y por tanto, la progresión del ciclo celular. Bajo condiciones desfavorables de crecimiento el complejo CDKA/CYC es inhibido por KRP, quedando la proliferación celular parada en la fase G1.

Adaptada de Inzé y De Veylder 2006

#### 2.1.1.2. Control de la transición G2/M

Durante la fase G2 del ciclo celular, las ciclinas de tipo A, B y D se asocian con las CDKA y CDKB formando el complejo CDKA-B/CYC. Este complejo es activado, al igual que en la transición anterior vía CAK, por la actuación de CDKF y el complejo CDKD/CYCH. La actividad de CDKA-B/CYC puede ser inhibida, en condiciones de estrés, por la fosforilación de los residuos Tyr15 y Thr4 por la quinasa WEE1, lo cual bloquea la unión del sustrato manteniendo la célula en interfase. La completa activación de este complejo requiere de la desfosforilación de ambos residuos por la fosfatasa CDC25 (Inzé y De Veylder 2006; De Veylder et al. 2003).

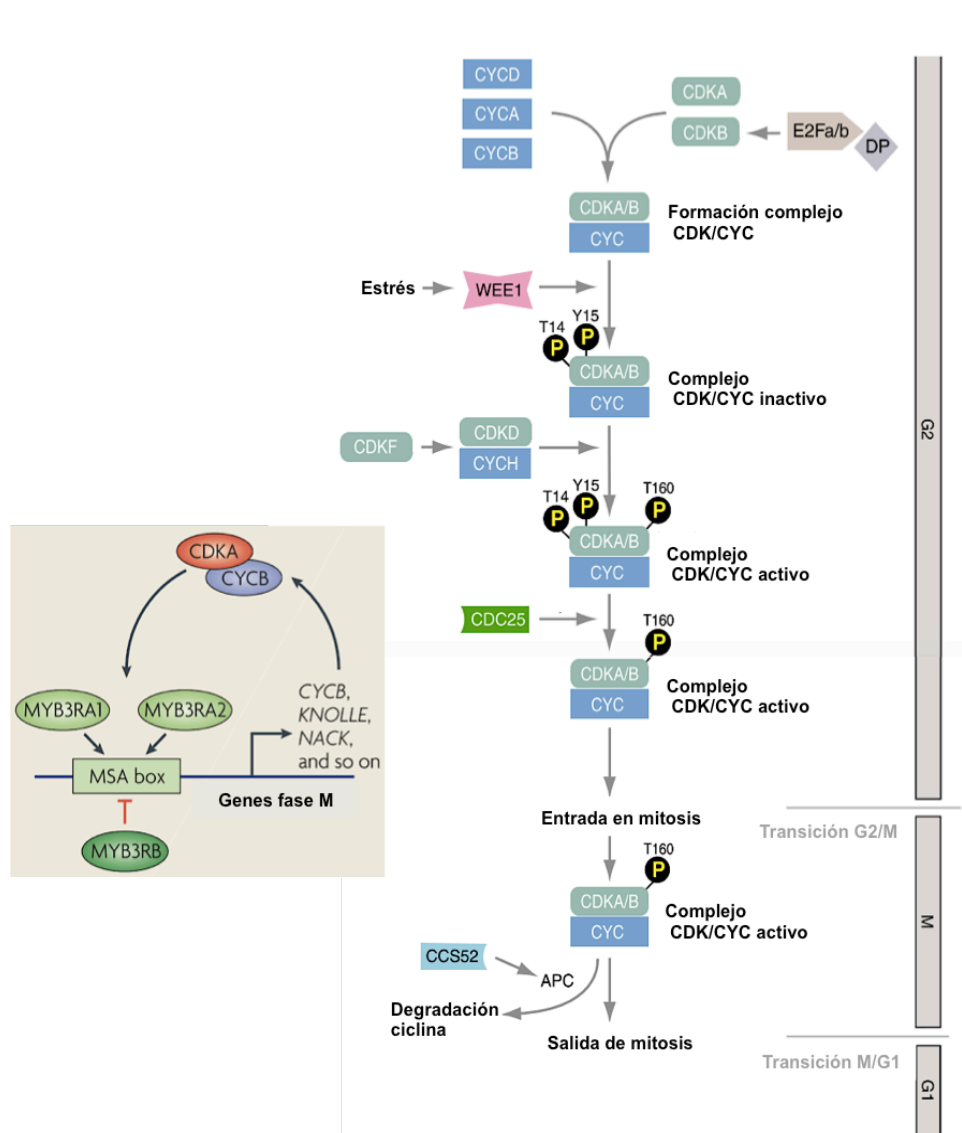
Una vez activo el complejo CDKA-B/CYC, éste fosforila a proteínas diana como son los activadores transcripcionales MYB3R. Los MYB3R fosforilados se unen a la caja MSA de



los genes diana permitiendo su expresión en la fase M y la entrada en mitosis (De Veylder et al. 2007; Berckmans y De Veylder 2009).

En plantas tres proteínas MYB3R han sido identificadas: MYB3RA1 y MYB3RA2 son activadores de la caja MSA presente en el promotor, mientras que MYB3RB actúa como inhibidor (Araki et al. 2004; Ito et al. 1998; Ito et al. 2001).

La salida de la fase M o mitosis requiere de la destrucción proteolítica de las ciclinas, que se inicia por la activación del complejo promotor de la anafase (APC) por su asociación con la proteína CCS52 (Inzé y De Veylder 2006) (FIGURA 10).



**Figura 10. Transición G2/M.** El complejo CDKA-B/CYC en condiciones de estrés puede ser inhibido por la quinasa WEE1 permaneciendo la célula en interfase. La completa activación de este complejo requiere de la fosforilación del residuo de Thr160 por CAK y las desfosforilación de los residuos Thr14 y Try15 por CDC25 para actuar sobre sustratos específicos como son las proteínas MYB3R y permitir la expresión de genes de la fase M y la progresión del ciclo celular.

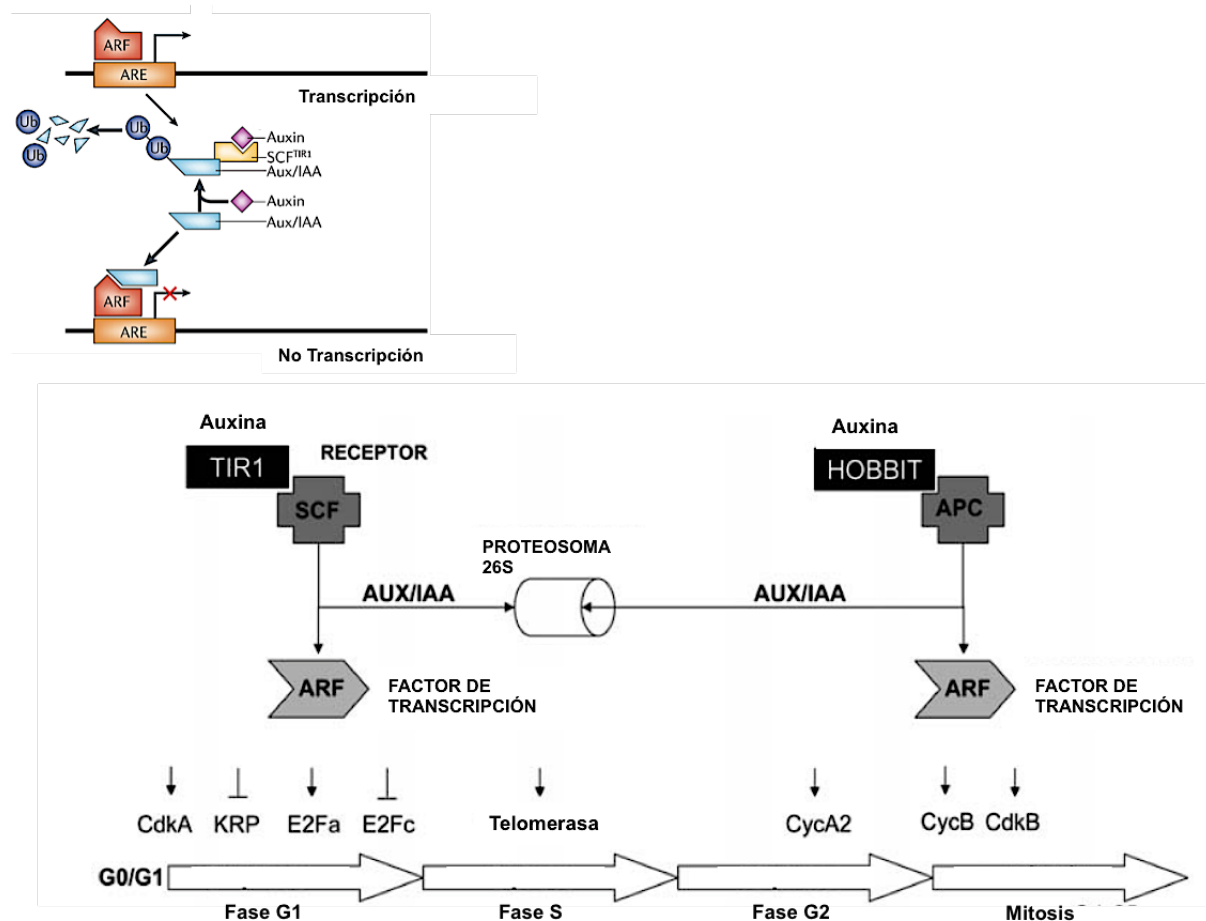
Adaptada de Inzé y De Veylder 2006 y De Veylder et al. 2007.

### 2.1.2. Acción de las auxinas, luz y azúcares en el ciclo celular

El ciclo celular está influenciado por varias fitohormonas, siendo el papel de las auxinas en la regulación del ciclo el mejor documentado. Otras hormonas, como las citoquininas, el ácido abscísico (ABA), el etileno, el ácido jasmónico (JA) y los brasinoesteroides, también tienen un impacto clave como mediadores de diversos estreses ambientales en la progresión o la parada del ciclo celular.

Las auxinas afectan al ciclo celular porque regulan la expresión de genes que controlan la activación del complejo SCF (*Skip1p-cullin-F-box complex*) y el complejo APC, resultando en un aumento en la degradación de proteínas inhibitoras, como KRPs o E2Fc y, por tanto, promoviendo el progreso del ciclo celular (Del Pozo et al. 2005; Hartig y Beck 2006).

En ausencia de auxinas, los factores de transcripción ARF (factores de respuesta a auxinas), que se encuentran unidos a los elementos de respuesta a auxinas o AREs en el promotor de diferentes genes, tienen unidas las proteínas Aux/IAA que mantienen reprimida la transcripción de estos genes. En cambio, en presencia de auxinas en el interior celular, éstas se unen al complejo SCF mediante TIR1 (*F-box*), lo que desencadena la degradación proteolítica de Aux/IAA al ser diana del proteosoma 26S por la adición covalente de ubiquitinas catalizada por la E3 ligasa del complejo SCF. Como consecuencia, se produce la transcripción de los genes de respuesta a auxinas (Teale et al. 2006), entre ellos, las ciclinas y factores de transcripción E2F implicados en la transición G1/S y que favorecen la progresión del ciclo celular (Del Pozo et al. 2002). El complejo promotor de la anafase (APC) también se activa por la unión de auxinas a su componente HOBBIT, lo que permite la expresión de genes que facilitan la transición G2/M y la progresión del ciclo celular (Blilou et al. 2002; Capron et al. 2003) (FIGURA 11).



**Figura 11. Regulación del ciclo celular por auxinas.** La auxinas regulan la progresión del ciclo al activar los complejos SCF y APC, en las correspondientes transiciones G1/S y G2/M, permitiéndose la expresión de genes implicados en las fases S y M (parte inferior). El mecanismo mejor estudiado es la expresión de genes de respuesta a auxinas mediada por el complejo SCF<sup>TIR1</sup>, por el cual en presencia de auxinas, éstas se unen a TIR1 lo que desencadena la degradación de la proteína Aux/IAA dependiente de ubiquitina-proteosoma 26S, liberándose de los elementos de respuesta auxinas o ARES de los factores de transcripción ARF y permitiendo la expresión de genes implicados en la progresión del ciclo celular (parte superior izquierda).

Adaptada de Teale et al. 2006 y Hartig y Beck 2006.

Una característica del proceso de fotomorfogénesis de las plántulas es que la misma señal lumínica puede producir respuestas distintas e incluso opuestas en diferentes tipos celulares, tejidos y órganos. La luz provoca la expansión de los cotiledones, la represión del crecimiento del hipocotilo y división celular y crecimiento en los meristemas (Nemhauser 2008).

El crecimiento del meristemo apical de plántulas de *Arabidopsis thaliana* es reprimido en oscuridad, pero rápidamente activado por luz. La luz provoca en este tejido una rápida represión en la expresión de genes implicados en dirigir la degradación de proteínas por ubiquitinación, como son los complejos: DET1, CSN5 y COP1. Estos complejos, son represores centrales de la fotomorfogénesis, que regulan de forma

coordinada los niveles de los factores de transcripción, E2Fb y E2Fc. Entonces, su represión por la luz resulta en una inhibición de E2Fc y una activación de E2Fb, lo que permite la progresión del ciclo celular ([FIGURA 12A](#)) (Mohammed et al. 2017; Lopez-Juez et al. 2008).

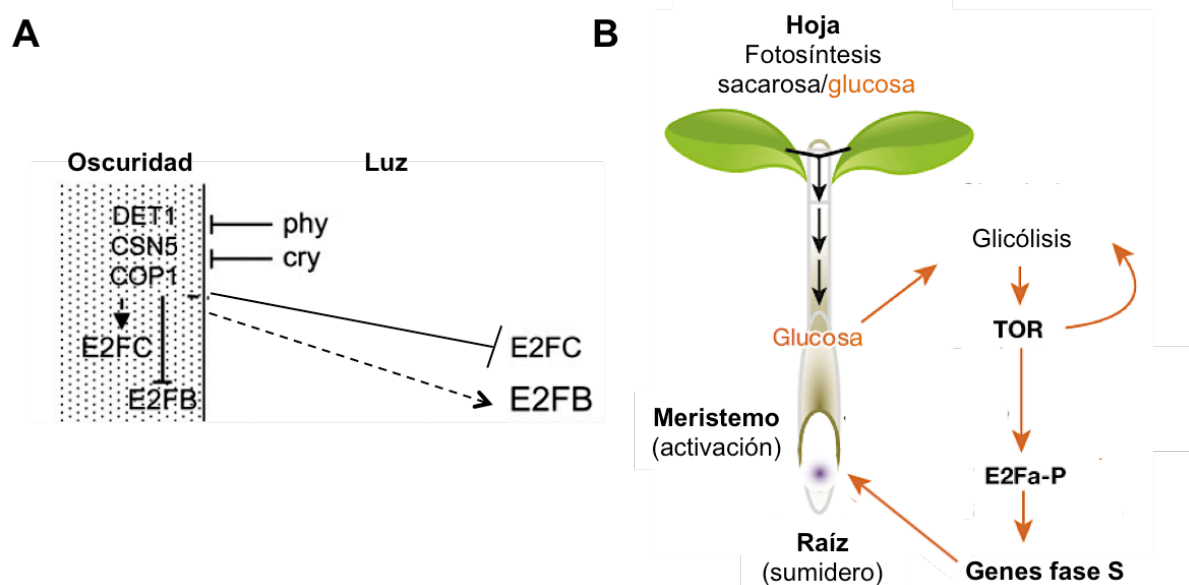
La luz también produce un aumento en la expresión de los factores de respuesta a auxinas, ARF3 y ARF4, y genes implicados en la regulación del ciclo celular. Entre estos últimos, la luz aumenta la expresión de CDKs de tipo B (CDKB1;1 y CDKB1;2) y de ciclinas de tipo A, B y D, entre las que se encuentran la CYCD3;3 (implicada en la transición G1/S) y la CYCB1;1 (implicada en la transición G2/M). Además, la luz produce una disminución en la expresión del inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas, KRP4. Estos cambios de expresión inducidos por la luz permiten que las células del meristemo apical, detenidas en las fases G1 y G2 en oscuridad, puedan continuar con su división al percibir la señal lumínica (Mohammed et al. 2017; Lopez-Juez et al. 2008). En el meristemo apical de plántulas de *Arabidopsis thaliana* crecidas en oscuridad se produce una acumulación de auxinas que inhiben su crecimiento, la cual es disipada cuando la plántulas son iluminadas, porque la luz provoca la polarización de PIN1 en la membrana plasmática produciéndose la exportación de esta hormona fuera del meristemo apical (Mohammed et al. 2017; Lopez-Juez et al. 2008).

La luz también regula la proliferación celular de forma indirecta, vía fotosíntesis. En la naturaleza, después de la germinación de la semilla en el suelo (oscuridad), los nutrientes de reserva de ésta son utilizados para la elongación del hipocotilo, mientras que el crecimiento de la raíz permanece detenido (nutrición heterótrofa). Cuando el hipocotilo alcanza la luz, su crecimiento se para, los cotiledones son transformados en hojas fotosintéticamente activas y la elongación de la raíz es inducida para poder captar agua y minerales del suelo (nutrición autótrofa) (Kircher y Schopfer 2012; Xiong et al. 2013).

Las plantas han desarrollado mecanismos para coordinar el crecimiento de tejidos fotosintéticos (partes aéreas) y no fotosintéticos (raíz), en los cuales los azúcares producto de la fotosíntesis son esenciales. La sacarosa generada fotosintéticamente en la parte aérea (cotiledones) actúa como una señal entre órganos al ser transportada por el floema hasta la raíz, donde es captada por las células meristemáticas en forma de

hexosas libres (glucosa y fructosa) tras su escisión por una invertasa extracelular (Sherson et al. 2003; Kircher y Schopfer 2012).

La glucosa es indispensable para la división celular, ya que la expresión de las ciclinas CYCD2 y CYCD3, que regulan la transición G1/S, únicamente depende de la presencia de este azúcar (Riou-Khamlichi et al. 2000). Además, otra vía de señalización por la cual las plantas compensan la falta de fotosíntesis en la raíz, permitiendo la proliferación del meristemo radicular en oscuridad, es la mediada por la quinasa TOR (*target-of-rapamycin*). La glucosa activa a esta quinasa, la cual fosforila al factor de transcripción E2Fa, permitiendo la expresión de genes de la fase S (FIGURA 12B) (Xiong et al. 2013).



**Figura 12. Regulación del ciclo celular por la luz y azúcares fotosintéticos.** A) En presencia de luz la señal lumínica es captada por los fotorreceptores (cry y phy) provocando una inhibición en la expresión de los complejos, DET1, CSN5 y COP1, resultando en la inhibición de E2Fc (represor transcripcional) y en la activación de E2Fb (activador transcripcional) y por tanto, en la progresión del ciclo celular por la expresión de los genes implicados en la fase S del ciclo. B) La glucosa producto de la fotosíntesis es esencial para la progresión del ciclo celular, ya que activa a la quinasa TOR, la cual tiene como sustrato directo el factor de transcripción E2Fa, llevando a cabo su fosforilación permitiéndose así la expresión de los genes de la fase S y la progresión del ciclo celular.

Adaptada de Lopez-Juez et al. 2008 y Xiong et al. 2013

## 2.2. Crecimiento celular

El crecimiento celular es un incremento de masa, resultado de la síntesis de macromoléculas, especialmente proteínas. En células proliferantes, el crecimiento es un proceso necesario para que éstas alcancen el doble de su tamaño antes de su división en dos células hijas del mismo tamaño que la célula parental. El crecimiento celular viene dado por la cantidad de proteínas, las cuales se sintetizan en los ribosomas, y por tanto, está íntimamente relacionado con la biogénesis de ribosomas.

El concepto de crecimiento celular referido a un incremento en la cantidad de proteína necesario para la proliferación, no debe confundirse con el concepto de expansión o elongación celular debido a un agrandamiento de las vacuolas asociado a procesos de diferenciación celular (Baserga 2007; Sablowski y Carnier Dornelas 2014).

### 2.2.1. Síntesis de ribosomas y nucléolo

La biogénesis de ribosomas se produce en un compartimento nuclear especializado, el nucléolo. Este proceso comienza con la transcripción del transcrito primario (pre-rRNA) a partir de los genes ribosómicos (rDNA), los cuales están repetidos cientos de veces en tándem formando el denominado “organizador nucleolar” (NOR), en los cromosomas 2 y 4 de *Arabidopsis thaliana* (Copenhaver y Pikkard 1996; Raška et al. 2006).

Cada unidad transcripcional o transcrito primario (pre-rRNA) se transcribe por la RNA polimerasa I (Pol I) y contiene los rRNAs 18S, 5,8S y 25S, separados por los espaciadores transcripcionales internos (ITS1 y ITS2) y flanqueados por los espaciadores transcripcionales externos (5'ETS y 3'ETS). Estos espaciadores deben ser eliminados de una manera coordinada para obtener los rRNAs maduros mediante un proceso llamado procesamiento del pre-rRNA (FIGURA 13) (Weis et al. 2015a).

En *Arabidopsis thaliana* el procesamiento del pre-rRNA comienza con la escisión endonucleolítica en el sitio B<sub>0</sub> por atRTL2 (endonucleasa), lo que permite el fin de la transcripción acorde con el “modelo torpedo”, donde el transcrito 3' residual es rápidamente degradado por una exonucleasa con actividad 5'-----3' (Comella et al. 2008). La siguiente etapa es la escisión en el sitio P, por XRN2 y una U3 snoRNP, dando lugar al pre-RNA 35S, el cual es procesado por dos rutas alternativas de forma simultánea a la eliminación del extremo 3'ETS (Zakrzewska-Placzek et al. 2010; Sáez-Vasquez et al. 2004).

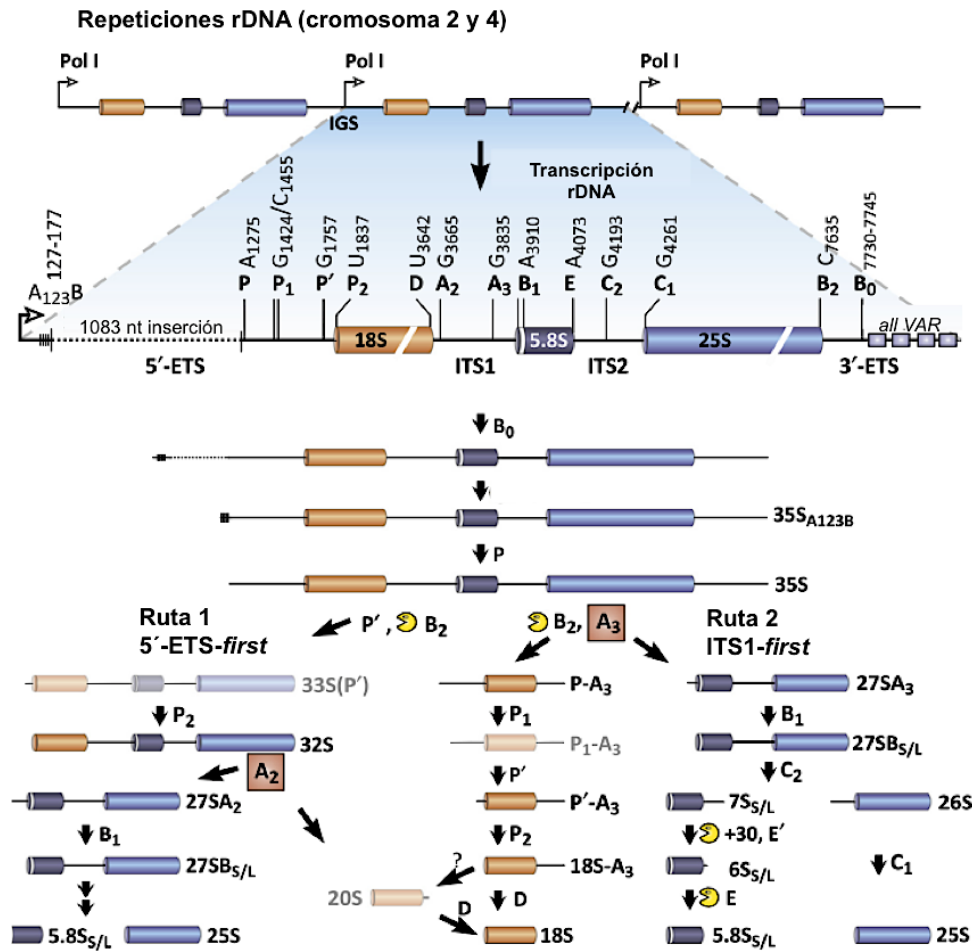
En la primera ruta (*5'ETS-first*) el extremo 5'ETS es eliminado por la escisión consecutiva de los sitios P' y P<sub>2</sub>, lo cual da lugar a los correspondientes 33S(P') y pre-rRNA 32S. Por último, la escisión en el sitio A<sub>2</sub> separa el pre-rRNA 32S en los pre-rRNAs 27SA<sub>2</sub> y 20S, los cuales dan lugar a los rRNAs 18S, 5,8S y 25S maduros.

En la segunda ruta (*ITS1-first*) la escisión en el sitio A<sub>3</sub> del ITS1 divide el pre-rRNA 35S en los pre-rRNAs P-A<sub>3</sub> y 27SA<sub>3</sub>. La siguiente eliminación del extremo 5'ETS conduce a 18S-A<sub>3</sub> y a la escisión final en el sitio D, la cual es llevada a cabo por la endonucleasa NOB1, liberándose el rRNA 18S maduro (Veith et al. 2012).

Los pre-rRNAs 27SA<sub>2/3</sub> de ambas rutas, dan lugar al rRNA 25S y a las formas corta y larga del rRNA 5,8S (5,8S<sub>S/L</sub>), en las cuales la eliminación exonucleolítica del ITS2 es llevada a cabo por enzimas del exosoma y el complejo TRAMP (RRPE, RRP46 y MTR4) (Lange et al. 2011; Xi et al. 2009) (FIGURA 13).

Recientemente han sido descritas cuatro variantes en el extremo 3'ETS del rDNA aguas abajo del sitio B<sub>0</sub> (FIGURA 13). Todas estas variantes (*all var*) poseen una secuencia de 13bp homóloga a la región de bisagra de las proteínas U3 snoRNA que se cree que actúa como una plataforma que coordina las primeras etapas del procesamiento de los extremos 5'ETS y 3'ETS. La expresión de las cuatro variantes del rDNA está estrechamente regulada durante el desarrollo temprano de la planta y los dos homólogos de la proteína nucleolina (NUC1 y NUC2) tienen un papel principal en la activación o silenciamiento de ciertas variantes al afectar el estado de metilación de las diferentes repeticiones del rDNA (Abou-Ellail et al. 2011; Durut et al. 2014; Pontvianne et al. 2010).

La coexistencia de estas dos rutas alternativas se cree que es para asegurar la generación de cantidades suficientes de ribosomas o dar lugar a la regulación en ciertas situaciones de estrés (Hang et al. 2014; Weis et al. 2015b).



**Figura 13. Procesamiento de rRNAs en la Biogénesis de ribosomas.** Etapas del procesamiento del transcrito primario o pre-rRNA que tienen lugar en el nucléolo, incluyendo las dos rutas que coexisten en *Arabidopsis thaliana*, mostrándose el orden y el lugar de las escisiones hasta la obtención de los rRNAs 25S, 18S y 5,8S maduros.

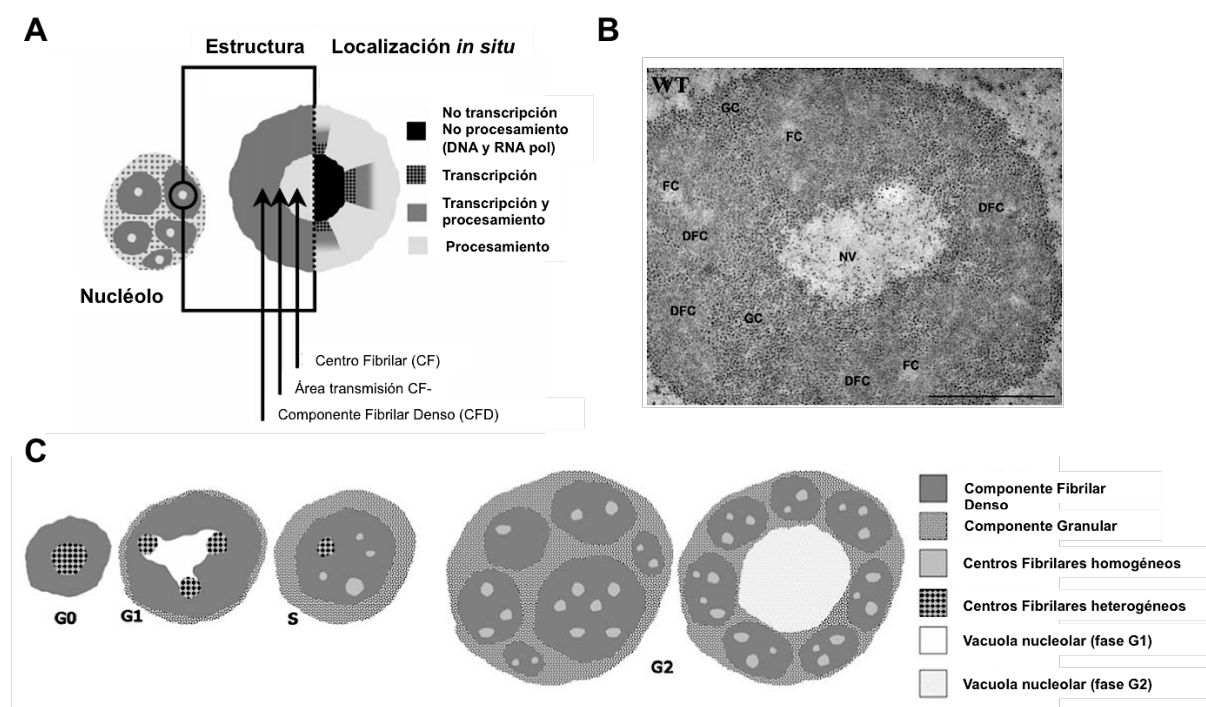
Adaptada de Weis et al. 2015b.

En el nucléolo tienen lugar todas las fases de la biogénesis de ribosomas a excepción de la síntesis del rRNA 5S y el ensamblaje final de la subunidades ribosómicas (Ciganda y Williams 2011). Ya que este proceso ocurre secuencialmente se observa un patrón vectorial de dentro afuera asociado a las distintas etapas de la biogénesis de ribosomas y que puede aparecer repetido dentro de cada nucléolo en función de su actividad. Desde un punto de vista morfológico, los centros fibrilares (CFs), situados en el centro, son los sitios de acumulación de rDNA y ensamblaje del complejo de transcripción. En la transición entre los CFs y el componente fibrilar denso (CFD) que los rodea ocurre la transcripción del transcrito primario o pre-rRNA. En la periferia del CFD y en el componente granular (CG) ocurren las etapas tardías del procesamiento del pre-rRNA y



el ensamblaje de las unidades ribosómicas para su posterior exportación al citoplasma y formar los ribosomas maduros (FIGURA 14A y B) (de Carcer y Medina 1999; Medina et al. 2000).

La morfología, estructura y actividad del nucléolo se modifica en función de las condiciones funcionales en las que se encuentre la célula, de manera que la organización de los componentes nucleolares es un indicador del tipo celular, de la actividad de la célula y de la etapa del ciclo celular. En la fase G1 del ciclo celular los nucléolos tienen una actividad moderada y suelen ser pequeños; en proporción, los CFs son pocos y grandes, el CFD es mayoritario y el CG es escaso o no existe. En cambio, en la fase G2 los nucléolos tienen una actividad alta, son de gran tamaño y poseen pequeños y múltiples CFs con abundante CG. Desde la transición G2/M hasta el final de la profase el nucléolo se desensambla y se produce la inactivación de los complejos macromoleculares de transcripción y procesamiento (FIGURA 14C) (González-Camacho y Medina 2006; Medina et al. 1995; Sáez-Vásquez y Medina 2008).



**Figura 14. Morfología, estructura y actividad del nucléolo relacionado con la biogénesis de ribosomas.** A) Esquema mostrando las distintas etapas de la biogénesis de ribosomas y el componente nucleolar donde tienen lugar. B) Imagen de microscopía electrónica de un nucléolo de una célula meristemática de la raíz de *Arabidopsis thaliana* donde se indican cada uno de los componentes estructurales del nucléolo: centros fibrilares (FC), componente fibrilar denso (DFC), componente granular (GC) y vacuola nucleolar (NV). C) Modelos nucleolares en las diferentes etapas del ciclo celular indicándose las diferentes distribuciones de sus componentes durante distintas fases del ciclo.

Adaptado de Carcer y Medina 1999; González-Camacho y Medina 2006.

## 2.2.2. Proteínas nucleolares

Las proteínas nucleolares interactúan con el rDNA y/o con diferentes intermediarios del procesamiento del pre-rRNA, por lo que juegan un papel importante en la regulación de la biogénesis de ribosomas, pero no forman parte de los ribosomas maduros. La nucleolina y la fibrilarina son dos proteínas nucleolares reguladas transcripcional y postraducionalmente en función del estado proliferativo de la célula y etapa del ciclo celular, por lo que pueden ser utilizadas como marcadores nucleolares indicadores del crecimiento celular (González-Camacho y Medina 2004, 2005; Petricka y Nelson 2007).

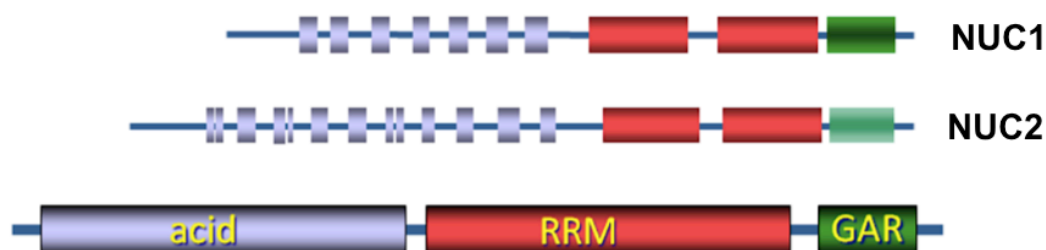
### 2.2.2.1. Nucleolina

La nucleolina es la proteína más abundante en el nucléolo de células proliferantes y es una proteína multifuncional que tiene un papel clave en diferentes etapas de la biogénesis de ribosomas, incluyendo el control de la transcripción del pre-rRNA y su procesamiento (Roger et al. 2003; de Carcer y Medina 1999). Esta proteína se localiza, en relación con su función, principalmente en el CFD alrededor de los CF (González-Camacho y Medina 2005, 2006; Medina et al. 2010; Pontvianne et al. 2007, 2010).

En *Arabidopsis thaliana* existen dos genes correspondientes a dos variantes de esta proteína: NUC1 y NUC2. El gen de la NUC2 está silenciado en condiciones normales (existe una expresión basal en algunos tejidos) y sólo se expresa cuando el gen principal (NUC1) está inactivo (línea mutante) o bajo condiciones de estrés (Pontvianne et al. 2007; Sáez-Vasquez et al. 2004; Sáez-Vasquez comunicación personal).

Esta proteína posee tres dominios funcionales bien caracterizados (Ginisty et al. 1999). El extremo N-terminal controla la transcripción del rDNA mediante su acción sobre la cromatina y su secuencia se caracteriza por tener secuencias repetidas ricas en aminoácidos ácidos separadas por regiones básicas en un número variable (Roger et al. 2003). El dominio central está formado por dos motivos de reconocimiento de RNA (RRM, *RNA Recognition Motifs*) implicados en la unión específica de RNA y en la afinidad de secuencias del pre-rRNA (Serin et al. 1996). El dominio C-terminal es una secuencia altamente conservada rica en glicina y arginina denominado dominio GAR (*Gly- and Arg-rich domain*) que interacciona con varias proteínas ribosómicas y de forma no específica con el RNA (Bouvet et al. 1998; Ghisolfi et al. 1992).

El dominio GAR está menos conservado en la proteína NUC2 que en NUC1, lo que sugiere que esta segunda variante pierde esta actividad (FIGURA 15) (Pontvianne et al. 2007).



**Figura 15. Estructura de las dos variantes de nucleolina en *Arabidopsis thaliana*.** Dominios funcionales o estructurales: secuencias repetidas ricas en aminoácidos ácidos en número variable (N-terminal), motivos centrales de reconocimiento de RNA (RRM) y dominio GAR (C-terminal).

En plantas la expresión de nucleolina es máxima en el meristemo radicular y aunque se ha detectado en otros órganos, en células diferenciadas está presente en niveles muy bajos (Pontvianne et al. 2007). Su actividad está controlada a varios niveles incluyendo, fosforilación (González-Camacho y Medina 2004; Morimoto et al. 2012), dimetilación (Lapeyre et al. 1986), ADP-ribosilación (Norbert y Jozefa 2018), glicosilación (Carpentier et al. 2005) además de degradación proteolítica (González-Camacho y Medina 2006).

Los niveles de nucleolina cambian a lo largo de las distintas fases del ciclo celular, siendo estos niveles mínimos en la fase G1, aumentando durante la fase S y alcanzando el máximo en la fase G2 justo antes de la mitosis y coincidiendo con la mayor tasa de producción de ribosomas (Medina et al. 2010).

### 2.2.2.2. Fibrilarina

La fibrilarina es otra proteína nucleolar de unos 34-38 kDa cuya estructura y función está altamente conservada en diferentes organismos eucariotas (Reichow et al. 2007).

En *Arabidopsis thaliana* existen dos genes que codifican a las proteínas FIB1 y FIB2 casi idénticas y probablemente con funciones similares (Barneche et al. 2000). Estas proteínas poseen motivos metiltransferasa (*AdoMet-dependent methyltransferase motifs* y *methyltransferase-like domain*) implicados en la metilación del pre-RNA (Wang et al. 2000; Niewmierzycka y Clarke 1999) y el dominio GAR responsable de su exportación al nucléolo e interacción con proteínas (Pih et al. 2000; Taliansky et al. 2010).

La fibrilarina fue localizada por primera vez en el componente fibrilar denso y su actividad en las primeras etapas del procesamiento de pre-RNA está bien estudiada, ya que se conoce que se une a los RNAs nucleolares de pequeño tamaño no codificantes o snoRNAs de tipo C/D para formar un complejo funcional activo que interviene que diferentes procesos como es la 2'-O-metilación de ribosas del rRNA y la escisión del espaciador externo 5'ETS (Sáez-Vasquez et al. 2004; Reichow et al. 2007). Además, debe participar en etapas más tardías del procesamiento del pre-RNA, debido a su localización *in situ* en las zonas proximales y distales del CFD respecto de los CFs (Cerdido y Medina 1995; Stanek et al. 2000).

La expresión del gen de la fibrilarina, al igual que la nucleolina, depende de la actividad transcripcional del nucléolo y de la progresión del ciclo celular, siendo mayores en células con alta actividad proliferativa (Cerdido y Medina 1995; Sáez-Vasquez et al. 2004; Medina et al. 2000).

### **2.2.3. Función de la luz y de los azúcares en el crecimiento celular**

El crecimiento celular (biogénesis de ribosomas) al igual que la proliferación (ciclo celular), son procesos dependientes del estado energético de la célula y por tanto se verán afectados por la presencia de luz y por la disponibilidad de nutrientes como la sacarosa en el entorno de la planta.

En el meristemo apical de plántulas de *Arabidopsis thaliana* la luz induce la expresión de proteínas ribosómicas, como los factores de transcripción TCP clase I (promotores de crecimiento) responsables de respuestas de crecimiento asociadas a la arquitectura de ramificación así como, los genes de translocación *RPS6* y *EBP1*. Además, el estímulo lumínico inhibe la expresión de factores de transcripción TCP clase II (TCP5), que son inhibidores de crecimiento actuando como represores en oscuridad (Lopez-Juez et al. 2008; Mohammed et al. 2017).

En las plantas, TOR actúa como un coordinador de crecimiento en tejidos y órganos activando la biogénesis de ribosomas y la traducción en la síntesis de proteínas. La biogénesis de ribosomas es un proceso con altos requerimientos energéticos por lo que de su activación depende la expresión de genes implicados en la biogénesis de ribosomas, y la inhibición de genes de autofagia acompañados de la activación de respuestas metabólicas para incrementar los niveles de azúcar, incluyendo la glicólisis,

el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) y el almacenamiento de almidón y lípidos (Caldana et al. 2013; Xiong et al. 2013).

La función de TOR en la regulación de la biogénesis de ribosomas también está apoyada por experimentos donde mutantes *tor* mostraron un reducido contenido en rRNA (Ren et al. 2012). La sobreexpresión de unos de los componentes de su ruta de señalización (TAP46) provocó una fuerte inducción en la expresión de genes que codifican ribonucleoproteínas reguladoras del procesamiento del pre-RNA (Ahn et al. 2015), y también una correlación directa entre los niveles de expresión de TOR y el tamaño de órganos, más pequeños o más grandes de lo normal (Deprost et al. 2007).

## 2.3. Función de la gravedad y de la luz en el crecimiento y proliferación celular

La gravedad y la luz, como se ha mencionado antes, son señales ambientales captadas por las plantas que provocan un cambio en la distribución de auxinas, las cuales actúan sobre proteínas reguladoras de la proliferación y el crecimiento celular, manteniendo la competencia meristemática para un correcto desarrollo de la planta.

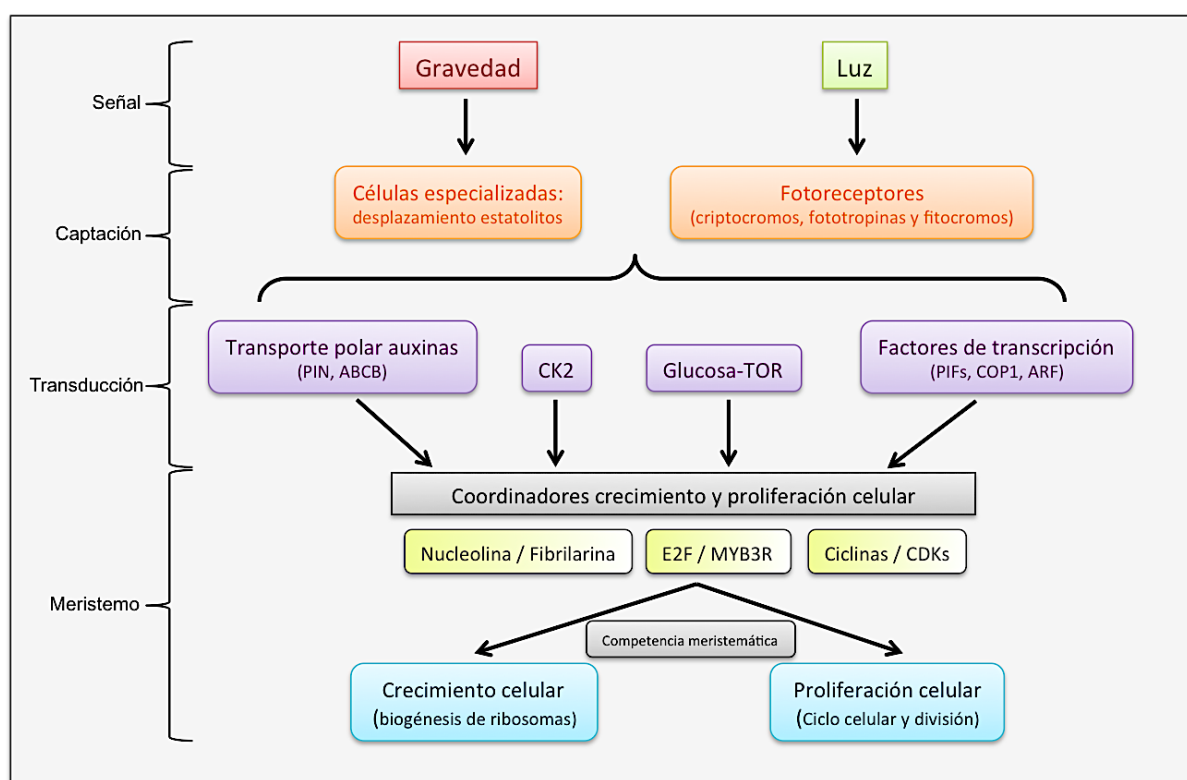
La caseína quinasa (CK2) es una proteína que puede actuar como intermediario entre la detección y transducción de estas señales porque en *Arabidopsis thaliana* juega un papel crítico en varios procesos fisiológicos como son la señalización de la luz, los ritmos circadianos, las respuestas a hormonas, el control del ciclo celular y el tiempo de floración (Sugano et al. 1999; Hardtke et al. 2000; Park et al. 2008; Bu et al. 2011).

Esta proteína es una serina/treonina quinasa altamente conservada en eucariotas, presente en todos los tejidos y su forma activa es un tetrámero formado por dos subunidades reguladoras  $\beta$  y dos subunidades catalíticas  $\alpha$ . En *Arabidopsis thaliana* cada subunidad está codificada por cuatro genes y su localización predominante es el núcleo, lo que está de acuerdo con que la mayoría de sus sustratos sean factores de transcripción o proteínas implicadas en la expresión y transcripción génica (Salinas et al. 2001, 2006; Martel et al. 2001).

La CK2 regula la biogénesis de ribosomas porque uno de sus sustratos en células proliferantes es la nucleolina y su fosforilación por la CK2 es necesaria para un procesamiento correcto del precursor pre-rRNA (Caizergues-Ferrer et al. 1987).

La actividad de esta proteína varía a lo largo del ciclo celular teniendo dos picos en la transición G1/S y en la fase M, siendo un regulador clave de la transición G2/M, como indica la parada en fase G2 en células de cultivo celular defectivas en esta proteína. Por lo tanto, la actividad de la CK2 está claramente asociada con la proliferación celular (Moreno-Romero et al. 2008; Espunya et al. 1999).

Por último, esta proteína también ha sido implicada en la regulación del transporte polar de auxinas, al proponerse la proteína PINOID como uno de sus sustratos, la cual es necesaria para la polarización de los transportadores de eflujo PIN y la correcta respuesta a estas dos señales ambientales (gravedad y luz) (Marquès-Bueno et al. 2011a, 2011b). Un resumen de las interacciones entre las rutas de transducción de las señales gravitatoria y luminosa que producen la modulación de los procesos del crecimiento y la proliferación celular se muestra en la [Figura 16](#).



**Figura 16. Esquema integrativo de la percepción de las señales ambientales, gravedad y luz, y su transducción para mantener la competencia meristemática.** La gravedad es captada por la sedimentación de los estatolitos y la luz por los fotorreceptores y estas señales son transmitidas mediante distintos mediadores (transporte polar de auxinas, factores de transcripción, CK2 y glucosa- TOR) que actúan sobre los coordinadores de crecimiento y proliferación celular (nucleolina / fibrilarina, E2F / MYB3R y Ciclinas / CDKs) para mantener la competencia meristemática y que tenga lugar un crecimiento y desarrollo de la planta correcto.

### **3. Biología de plantas en microgravedad real y simulada**

La aceleración de la gravedad es una señal constante, tanto en magnitud ( $9,8 \text{ m/s}^2$ ) como en dirección, que las plantas han utilizado a lo largo de su evolución para orientar y organizar sus células, tejidos y órganos (Takayuki Hoson 2014; Wolverton y Kiss 2009). Conocer cómo afecta la ausencia de esta señal al crecimiento y desarrollo de las plantas es esencial para la exploración humana del espacio o futura ocupación de otros planetas por el ser humano, ya que las plantas superiores son una parte integral de los Sistemas de Soporte Vital, los cuales deben ser autosuficientes y bioregenerativos. Es decir, existe una obligada interrelación entre las plantas y el ser humano en un ambiente fuera de la Tierra, ya que las plantas reciclan el agua, los minerales y el aire (contaminados por los desechos del metabolismo humano, como el  $\text{CO}_2$ ) y son además una fuente directa de alimento (Paul et al. 2013a; Ferl et al. 2002).

La Estación Espacial Internacional (ISS) proporciona a los investigadores un laboratorio en que disponemos de condiciones estables de microgravedad real, teniendo la oportunidad de estudiar, entre otros muchos problemas derivados de estas condiciones ambientales, el crecimiento de las plantas y por tanto, ensayar sus alteraciones en un posible viaje espacial de larga duración. Aunque esta instalación espacial es el mejor escenario para estos estudios, también tiene limitaciones como son: la limitación en el número de experimentos, sus dimensiones y su complejidad, la exposición a radiación cósmica, la reducida disponibilidad de nutrientes u otras condiciones ambientales, etc. Además, el acceso a sus instalaciones es muy limitado y costoso, resultando en largos periodos de espera entre experimentos. La reproducibilidad y la posibilidad de repetir un experimento fallido es escasa debido a la logística y el gasto económico, por lo que es imperativo maximizar el rendimiento científico de un experimento espacial (Vandenbrink y Kiss 2015).

Reproducir los niveles de gravedad aparente en la ISS ( $10^{-5} - 10^{-6} g$ , debido a las vibraciones, ya que la estación en órbita se considera en gravedad cero) se puede conseguir en la Tierra de distintas maneras (microgravedad simulada). La torre de caída libre (1-4 segundos de microgravedad) o los vuelos parabólicos (alternan periodos de aproximadamente 30 segundos de microgravedad e hipergravedad) y los cohetes ( $< 1$  hora microgravedad) recrean la caída libre orbital, pero el tiempo de

exposición de la muestra a microgravedad no es suficiente para la mayoría de los experimentos con plantas, ya que el tiempo de respuesta de éstas es mayor que el tiempo de exposición (Vandenbrink y Kiss 2015; Herranz et al. 2013).

Por ello, varias instalaciones de simulación en Tierra o GBFs (*Ground Based Facilities*) han sido diseñadas para proporcionar tiempos largos de exposición a microgravedad (Brungs et al. 2016). Entre estas instalaciones se encuentran los levitadores magnéticos, que se basan en el principio físico de levitación diamagnética del agua y material orgánico, de manera que la aplicación de un campo magnético de alta energía con un importante gradiente de campo produce una fuerza de levitación en dirección opuesta al vector gravedad que contrarresta a este último (Christianen 2010). Estas instalaciones permiten estudiar diferentes niveles de gravedad al mismo tiempo (compensación parcial o solapamiento de ambas fuerzas), pero tienen el inconveniente de que el propio campo magnético puede afectar la respuesta biológica de la muestra control (Herranz et al. 2012; Ana I. Manzano et al. 2013).

El clinostato 2D y la *Random Positioning Machine* (RPM) o clinostato 3D se basan en hacer rotar la muestra colocada en su interior de manera que distribuye espacialmente y de forma continua la dirección del vector gravedad dejando de ser ésta percibida por la muestra con una dirección concreta. La diferencia entre ambos clinostatos es que el primero solo posee un eje de rotación, mientras que el segundo posee dos (van Loon 2007). La *Random Positioning Machine* (RPM) es una versión más elaborada del clinostato 2D (modo *real random*) en la que la dirección de rotación de ambos ejes cambia de forma que genere una distribución aleatoria de la posición de la muestra en los tres ejes del espacio.

La elección de las instalaciones que simulan microgravedad en la Tierra se debe basar en el sistema biológico en estudio, es decir, en su tiempo de respuesta y en la compatibilidad con el diseño experimental, por lo que es deseable contrastar si el método de simulación ha sido utilizado con éxito antes con resultados comparables a los de algún experimento en microgravedad real. La mayoría de los experimentos realizados en estas instalaciones de simulación forman parte de actividades previas a un experimento espacial o para completarlos con experimentos, que por su complejidad, no pueden desarrollarse en la ISS (Herranz et al. 2013).



### 3.1. Experimentos previos en microgravedad real y simulada

Los trabajos que se recogen en esta Tesis Doctoral se enmarcan en una línea de investigación iniciada hace más de quince años que pretende desvelar cómo y por qué se pierde la competencia meristemática al principio del desarrollo de las plantas en el espacio, un descubrimiento realizado por el propio grupo de investigación. En los últimos años se han realizado un gran número de experimentos, tanto en microgravedad real (ISS), como microgravedad simulada (GBFs), que nos han ayudado a comprender cómo la falta de esta señal afecta al crecimiento y el desarrollo de las plantas.

#### 3.1.1. Experimento “ROOT”

El experimento “ROOT”, dirigido por el Dr. Francisco Javier Medina (CIB-CSIC), se llevó a cabo en la ISS durante el curso de la misión Cervantes en el año 2003. En este experimento espacial pionero en la ISS, plántulas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo “Columbia” germinaron y crecieron durante 4 días en oscuridad y posteriormente fueron fijadas con paraformaldehído, utilizando los contenedores *biorack* de tipo I con un sistema de ampollas (*berlingot*) en el interior (FIGURA 17 y 18). Este hardware sólo permitía la activación (hidratación) y fijación química de las muestras, sin control activo sobre el ambiente del experimento (temperatura y humedad de la cabina).

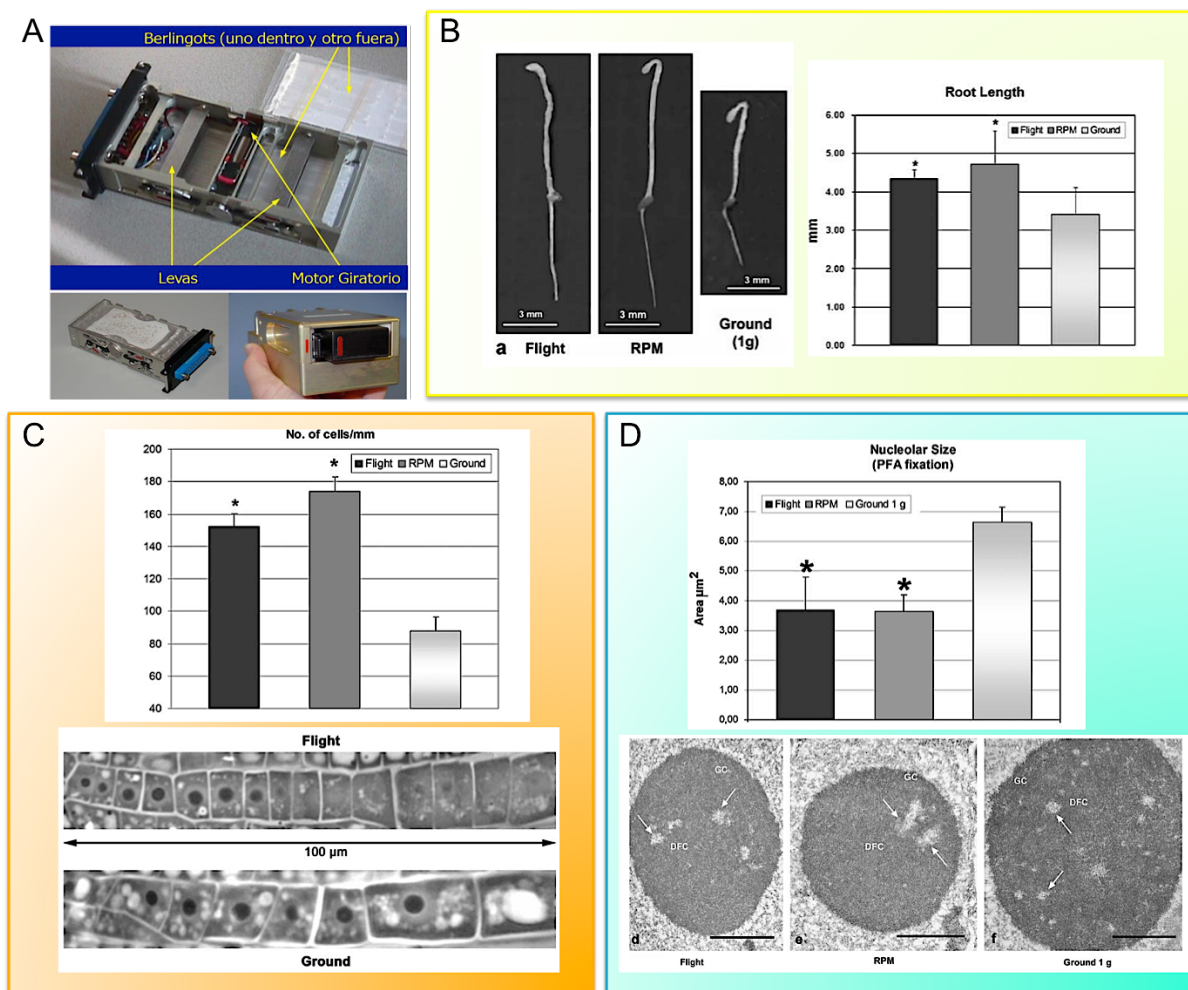


Figura 17. Parche de la Misión Espacial Cervantes de la que formó parte el experimento “ROOT”.

El estudio del crecimiento de estas plantas para conocer el efecto de la ausencia de gravedad en la competencia meristemática se realizó cuantificando la longitud de las plántulas, el número y tamaño de las células del meristemo radicular (proliferación celular) y analizando la morfometría, ultraestructura e inmunocitología del nucléolo (crecimiento celular). Los resultados obtenidos revelaron que en las muestras crecidas

en microgravedad real se producía un aumento de la proliferación y una disminución del crecimiento celular en comparación con su control 1g (gravedad terrestre), indicando que la ausencia de gravedad es un estrés capaz de desacoplar ambos procesos, los cuales están totalmente coordinados en condiciones terrestres estándar de crecimiento (Matía et al. 2005).

Este experimento en microgravedad real fue acompañado de otro realizado en condiciones de microgravedad simulada utilizando la RPM. El diseño y análisis de las muestras fue similar al experimento anterior, pero se tomaron muestras de forma secuencial a los 2, 4 y 8 días de crecimiento, y se incorporó una línea reportera de la proteína CYCB1;1 (*CYCB1;1:uidA*). Los resultados obtenidos en este experimento fueron muy similares al experimento espacial confirmándose un desacople entre crecimiento y proliferación celular en el meristemo radicular en microgravedad, apoyado también por una menor expresión de la CYCB1;1 en la condición experimental. El efecto de la microgravedad fue mayor a los 2 días de crecimiento disminuyendo o estabilizándose a los 4 y 8 días ([FIGURA 18](#)) (Matía et al. 2007, 2009, 2010).



**Figura 18. Resultados más relevantes obtenidos en el experimento espacial "ROOT" (microgravedad real) y en su experimento complementario en la RPM (microgravedad simulada).** A) Contenedores *biorack*. B) Imágenes de plántulas crecidas en las diferentes condiciones de gravedad estudiadas (izquierda) y su correspondiente medida de la longitud de la raíz (derecha). C) Imágenes tomadas en el microscopio óptico de células meristemáticas de la punta de raíz de plántulas crecidas en microgravedad real y gravedad terrestre (parte superior) sobre las que se realizó la medida del parámetro indicador de proliferación celular (parte superior). C) Imágenes tomadas en el microscopio electrónico de transmisión de nucléolos de plantas crecidas tanto en microgravedad real como simulada y su correspondiente control 1g en Tierra (parte inferior) junto con el área nuclear media obtenida para cada condición experimental (parte superior). El asterisco (\*) indica diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) respecto al control 1g en Tierra.

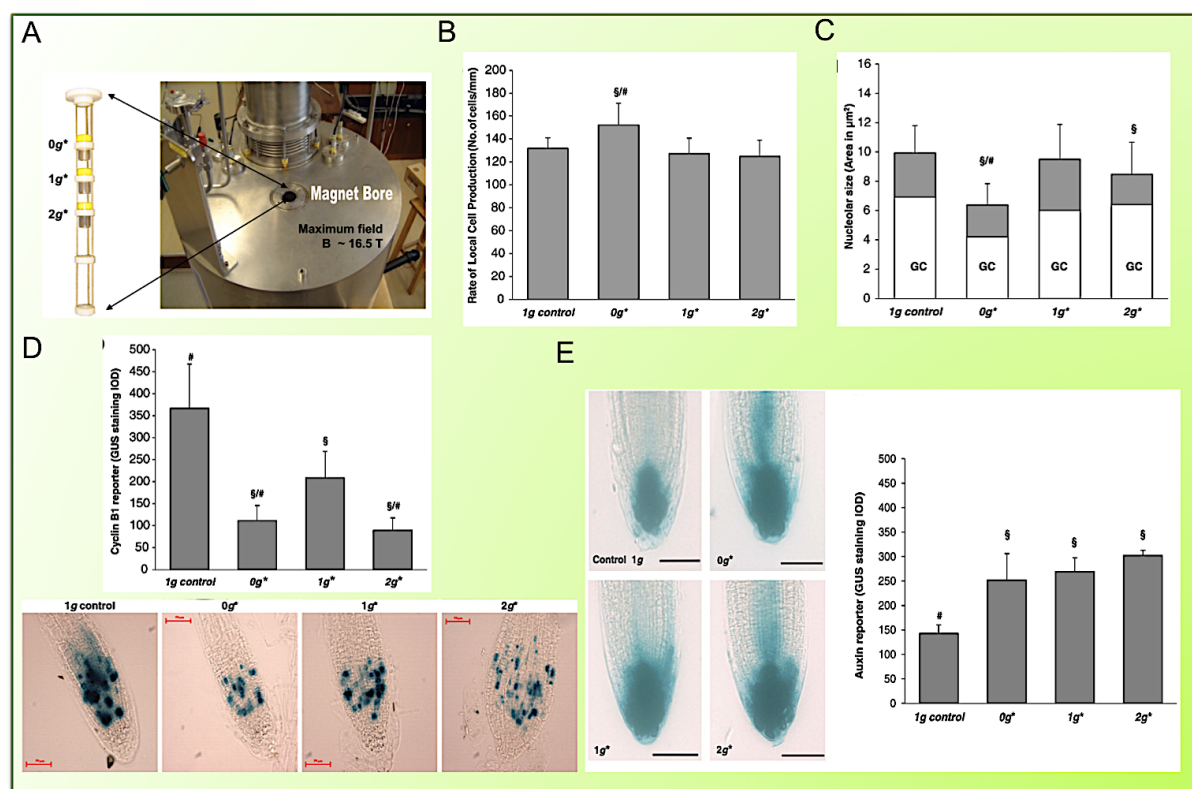
Adaptado de Matía et al. 2005, 2009.

### 3.1.2. Experimentos posteriores en microgravedad simulada

Además de realizar experimentos en microgravedad simulada en la RPM, también se realizaron experimentos complementarios en el Levitador Magnético, que tiene la ventaja adicional de que simultáneamente se pueden estudiar muestras expuestas a distintos niveles de gravedad efectiva inducidos por un campo magnético ( $0g^*$ ,  $1g^*$  y  $2g^*$ ). Los resultados obtenidos fueron similares a los del experimento en la RPM, pero el efecto fue menos marcado, especialmente en cuanto a la proliferación y la longitud de la

plántulas. Una novedad introducida en este último experimento fue el uso de la línea DR5:GUS para estudiar el patrón de distribución de auxinas en la punta de la raíz, obteniéndose para todos los niveles de gravedad ensayados un patrón similar al causado por la inhibición, inducida por drogas, del transporte polar de auxinas (FIGURA 19) (Ana I. Manzano et al. 2009, 2013).

Estos resultados, tomados todos juntos, muestran que la ausencia de gravedad en oscuridad es un ambiente de estrés para células proliferantes, expresado como un desacople entre dos procesos altamente regulados en la gravedad terrestre, como son la proliferación y el crecimiento celular. El aumento de la proliferación celular no está acompañado con un incremento en los niveles de expresión de la CYCB1;1, sino por una disminución, lo cual puede ser debido a un acortamiento de la fase G2 del ciclo celular.

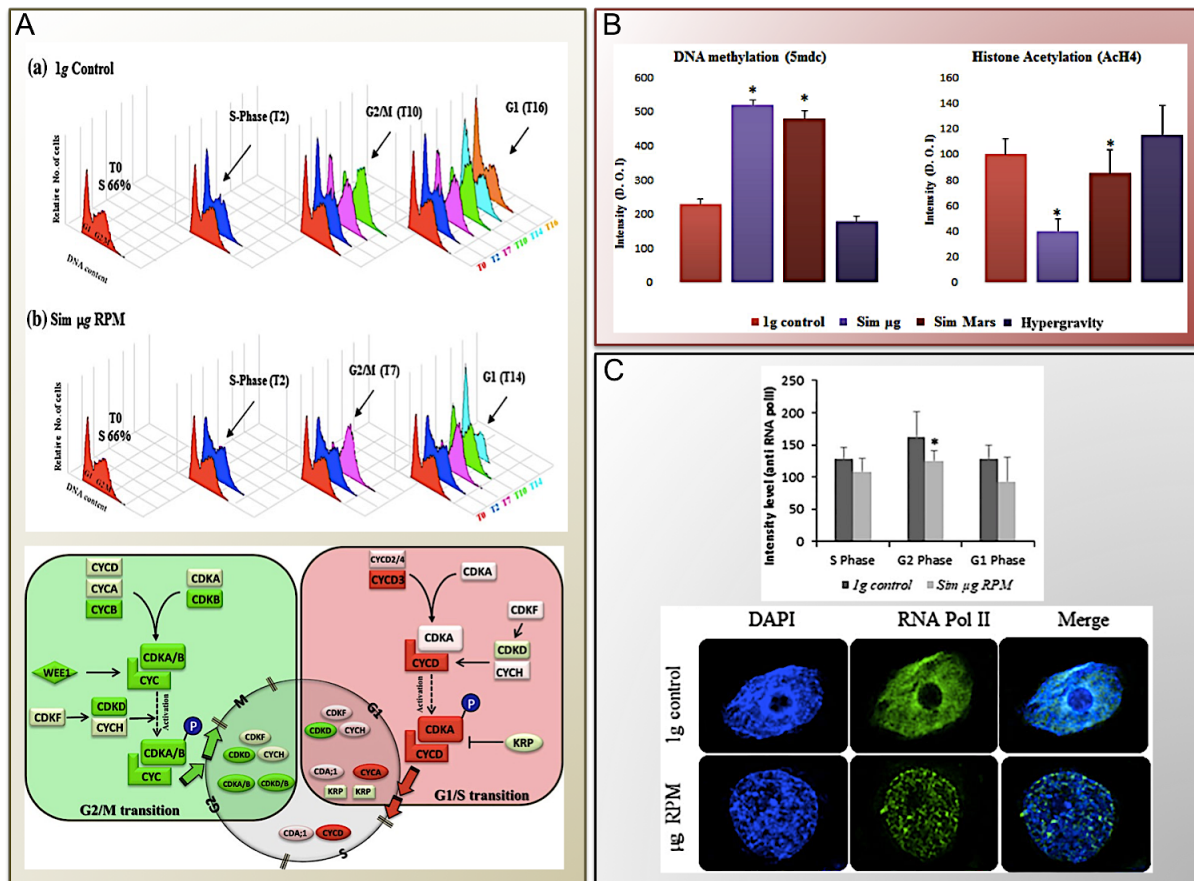


**Figura 19. Resumen de resultados obtenidos en los experimentos realizados en el levitador magnético.** A) Levitador magnético indicando el nivel de gravedad sufrido por las muestras en función de su posición en su interior ( $g^*$ ). B) Ratio local de producción celular (nº células/mm en cada fila de células del meristemo radicular) en los tres niveles de gravedad producidos por el campo magnético ( $0g^*$ ,  $1g^*$  y  $2g^*$ ) y en el control externo  $1g$ . C) Tamaño medio de los nucleólos y el porcentaje de componente granular para cada una de las condiciones experimentales. D) Cuantificación de la expresión de la ciclina B1 (parte superior) revelada por tinción GUS (parte inferior) para los distintos niveles de gravedad estudiados. E) Patrón de distribución de auxinas en la punta de la raíz revelado por tinción GUS (izquierda) y su cuantificación (derecha) para las distintas posiciones en el levitador y en el control externo  $1g$ . El símbolo  $\xi$  indica diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) respecto del control externo  $1g$  y el símbolo # respecto al control  $1g^*$  en el interior del levitador magnético.

Adaptado de Ana I. Manzano et al. 2013.

Además de los estudios sobre plántulas, se han realizado en nuestro laboratorio estudios sobre los efectos celulares de la microgravedad utilizando como sistema modelo la línea de cultivo celular MM2d (*Arabidopsis thaliana* ecotipo *Landsberg erecta*) incubados en un dispositivo de simulación (RPM). Los experimentos realizados con esta línea celular, tanto en microgravedad como en niveles parciales de gravedad (0,38g RPM<sup>SW</sup>), han demostrado que niveles de gravedad diferentes a los presentes en la Tierra provocan efectos en la proliferación y crecimiento de éstas células indiferenciadas. En concreto, mediante un abordaje con múltiples técnicas analíticas (citometría de flujo, inmunofluorescencia, microscopía electrónica y qRT-PCR) se ha contrastado que niveles alterados de gravedad provocan una aceleración del ciclo celular, mediante un acortamiento de la fase G2/M, y una disminución del tamaño celular por una menor actividad nucleolar tanto en cultivo asincrónico, como en cultivo sincronizado con afidicolina. Además, por primera vez se evidencia que en estos niveles de gravedad ( $\mu g$  y 0,38g RPM<sup>SW</sup>) se produce una disminución generalizada de la transcripción y un aumento de la condensación de la cromatina, acompañado de un aumento en la metilación del DNA y una disminución en la acetilación de la histona H4, respecto del correspondiente control en Tierra 1g ([FIGURA 20](#)) (Kamal et al. 2018a, 2018b).



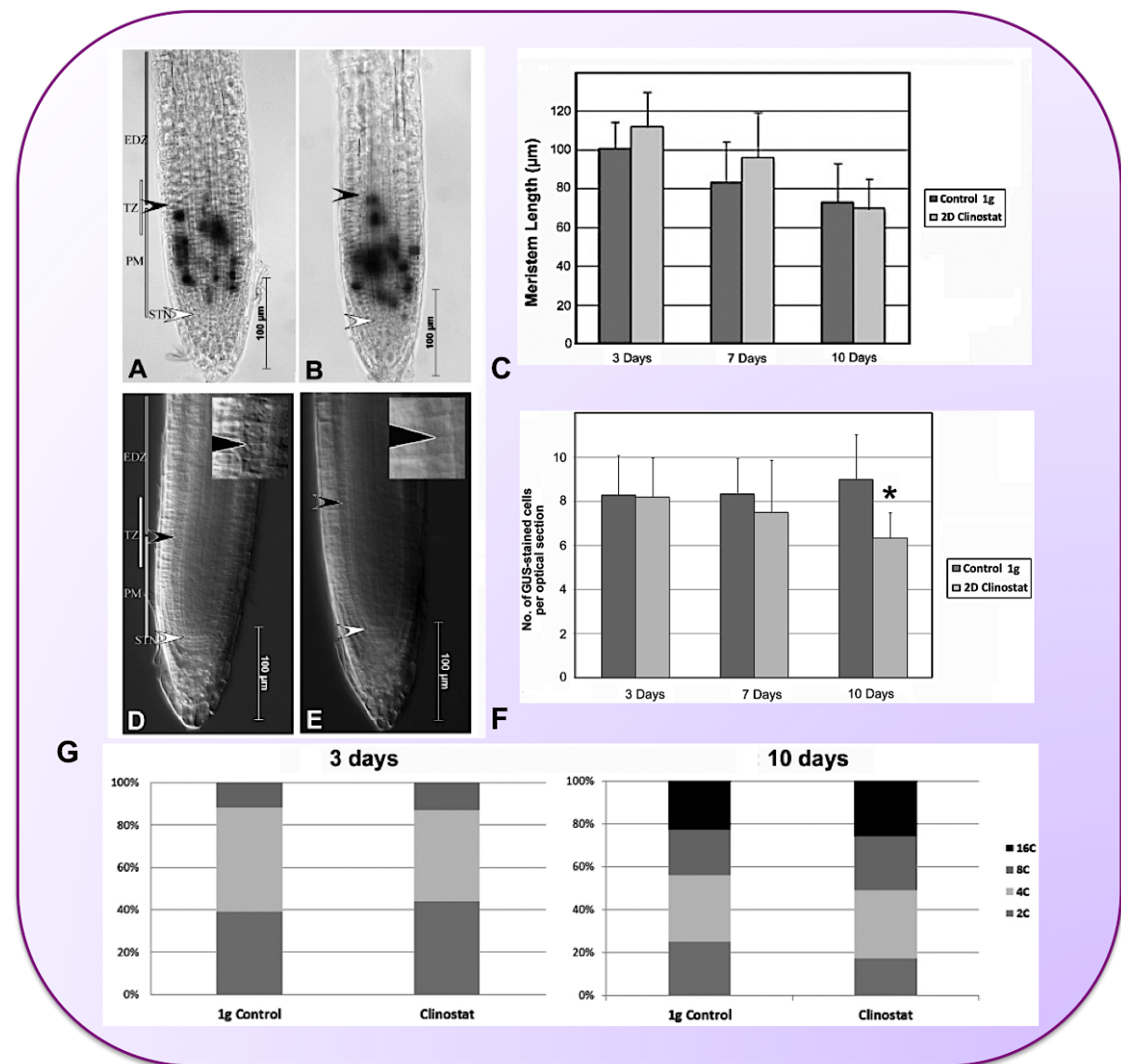


**Figura 20. Resultados más relevantes obtenidos en experimentos realizados con la línea de cultivo celular MM2d en la RPM.** A) Progresión sincrónica del ciclo celular observada por citometría de flujo (arriba) y esquema representativo del progreso del ciclo celular (abajo) en microgravedad simulada mostrando los genes con expresión inducida (rojo) y reprimida (verde) en comparación con el control 1g (microarray). B) Estudio cuantitativo de los cambios inducidos por niveles de gravedad alterada en la metilación del DNA y en la acetilación de la histona H4 medido por la intensidad de la señal de fluorescencia tras inmunolocalización. C) Patrón estructural de la cromatina detectado por DAPI (azul) y patrón transcripcional detectado por inmunofluorescencia anti-RNA pol II (verde) junto con la cuantificación de la intensidad de fluorescencia para cada fase del ciclo celular. El asterisco (\*) indica diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) respecto al control 1g.

Adaptado de Kamal et al. 2018a, 2018b.

En trabajos publicados más recientemente se introdujo la iluminación como un factor ambiental en el régimen de crecimiento de las plántulas, mediante la incorporación de luces LEDs en los simuladores, para así poder estudiar el efecto conjunto de la microgravedad y la luz sobre la competencia meristemática radicular. El primero de estos trabajos utilizó como simulador de microgravedad un clinostato 2D con eje horizontal en el que plantas de *Arabidopsis thaliana* de la línea reportera *CYCB1;1:uidA* crecieron durante 3, 7, y 10 días con un régimen lumínico de fotoperiodo (16h luz blanca/8h oscuridad). La competencia meristemática de las raíces de estas plantas fue estudiada midiendo los siguientes parámetros: tamaño meristemo (longitud meristemo y número de células), expresión del gen ciclina B1 (tinción histológica GUS) y frecuencia

de las fases del ciclo celular (citometría de flujo de la punta de la raíz). Los resultados de estos análisis indicaron que únicamente a los 10 días de crecimiento ocurría una disminución en el porcentaje de células en fase G1 (2C) y en la expresión del gen de la ciclina B1, en comparación con su correspondiente control 1g (clinostato 2D con eje vertical) (FIGURA 21) (Boucheron-Dubuisson et al. 2016).



**Figura 21. Resumen de resultados obtenidos en el Clinostato 2D con régimen de iluminación de fotoperiodo.** Imágenes del meristemo radicular de plantas de la línea reportera *CYCB1;1:uidA* crecidas en gravedad terrestre (A y D) y en microgravedad simulada (B y E) sobre las que se ha cuantificado la longitud del meristemo (C) y la expresión del gen de la ciclina B1 (F) a los 3, 7 y 10 días de crecimiento. G) Frecuencia o porcentaje de cada una de las fases del ciclo celular estudiada por citometría de flujo en la punta de la raíz a los 3 y 10 días de crecimiento. El asterisco (\*) indica diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) respecto al control 1g.

Adaptado de Boucheron-Dubuisson et al. 2016.

El segundo de los trabajos recogió experimentos en microgravedad simulada ya directamente relacionados con los primeros experimentos espaciales del proyecto “Seedling Growth” (ver sección 3.1.4 más adelante). En ellos, plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo *Landsberg erecta* (WT) y dos líneas de mutantes de fitocromo, *phyA* y *phyB*, fueron sometidas a microgravedad simulada en la RPM durante 6 días. El régimen de iluminación fue durante los 4 primeros días de fotoperiodo (16h luz blanca/8h oscuridad) para todas las plántulas, pero durante los 2 últimos días unas plantas fueron fotoestimuladas con luz roja constante y otras mantenidas en oscuridad, porque el objetivo de este experimento era caracterizar la respuesta de las plantas a la luz roja cuando ya lo han hecho a la falta de gravedad. En paralelo se realizó un control 1g con los mismos parámetros de iluminación.

La longitud de la raíz de las plantas mantenidas en oscuridad y microgravedad para las líneas WT y *phyB* fue significativamente mayor que en sus correspondientes controles 1g. En cambio, esta diferencia no ocurrió en las plantas iluminadas con luz roja, donde las raíces de ambos niveles de gravedad mostraron longitudes similares (FIGURA 22A).

La proliferación celular (nº células/mm) sufrió un aumento en las plantas WT y mutantes *phyB*, pero una disminución en el mutante *phyA*, en comparación con el control, cuando éstas permanecen en oscuridad los dos últimos días de su periodo de crecimiento. Este parámetro no mostró diferencias, respecto a la condición control, en la línea mutante *phyA* y sufrió una disminución en la líneas WT y *phyB* cuando éstas eran fotoestimuladas (FIGURA 22B).

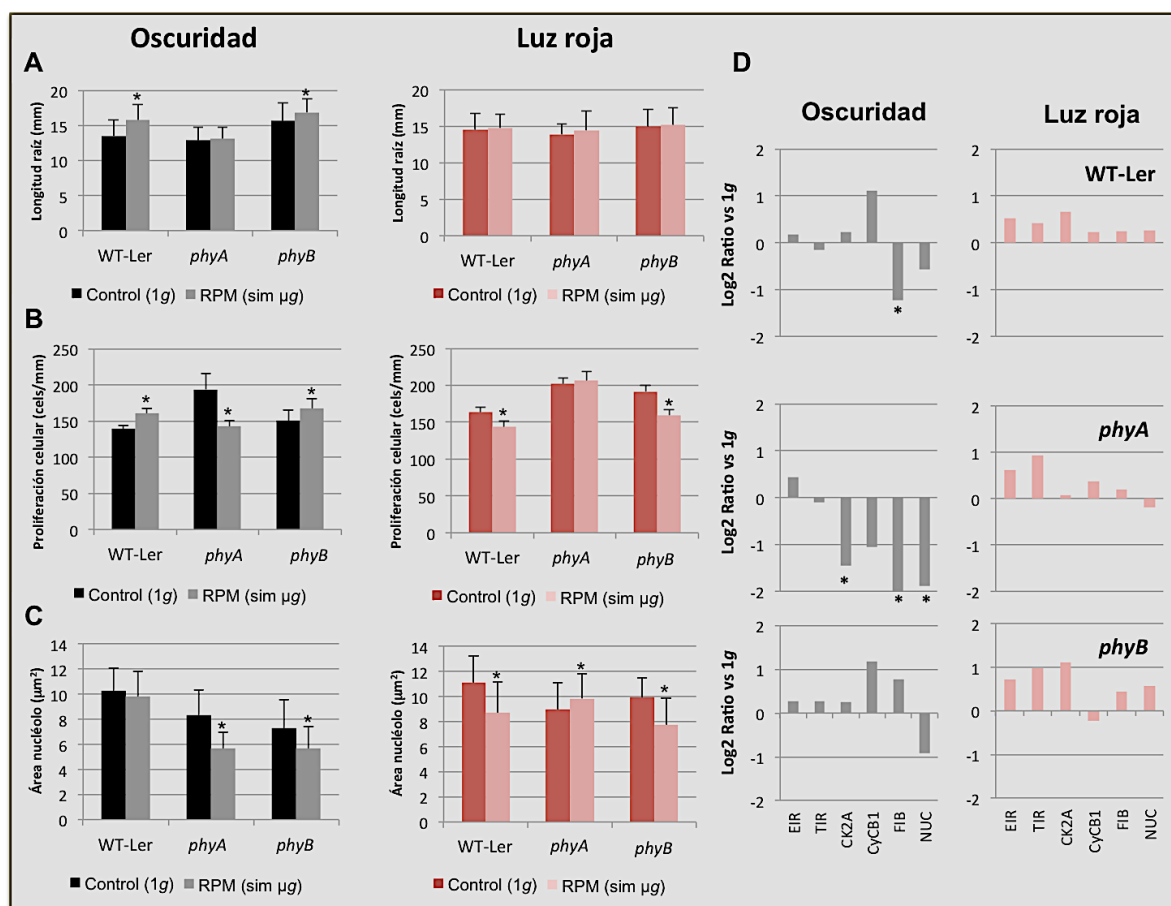
Por último, el crecimiento celular (tamaño nucléolo) mostró una disminución en las tres líneas de plantas analizadas en oscuridad, que se mantuvo en las plantas WT y *phyB*, pero que aumentó en las plantas *phyA* cuando crecieron con luz roja (FIGURA 22C).

Estos mismos procesos biológicos también fueron analizados mediante qRT-PCR, utilizando marcadores para cada uno de ellos (proliferación celular: *CYCB1* y *CK2A*; crecimiento celular: *NUC* y *FIB*). Los mismos efectos observados a nivel celular fueron encontrados a nivel molecular en las muestras sometidas a oscuridad. En cambio, cuando las plantas son irradiadas con luz roja los cambios de expresión son totalmente revertidos, siendo equivalentes a los obtenidos en el control de gravedad terrestre (FIGURA 22D).

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran, como en los estudios previos descrito anteriormente, que la microgravedad en ausencia de cualquier otra señal



tropística (oscuridad) provoca una alteración del crecimiento y proliferación celular, pero que cuando las plantas son fotoestimuladas con luz roja, se produce una reversión parcial de los efectos observados, principalmente para la proliferación celular (Valbuena et al. 2018).



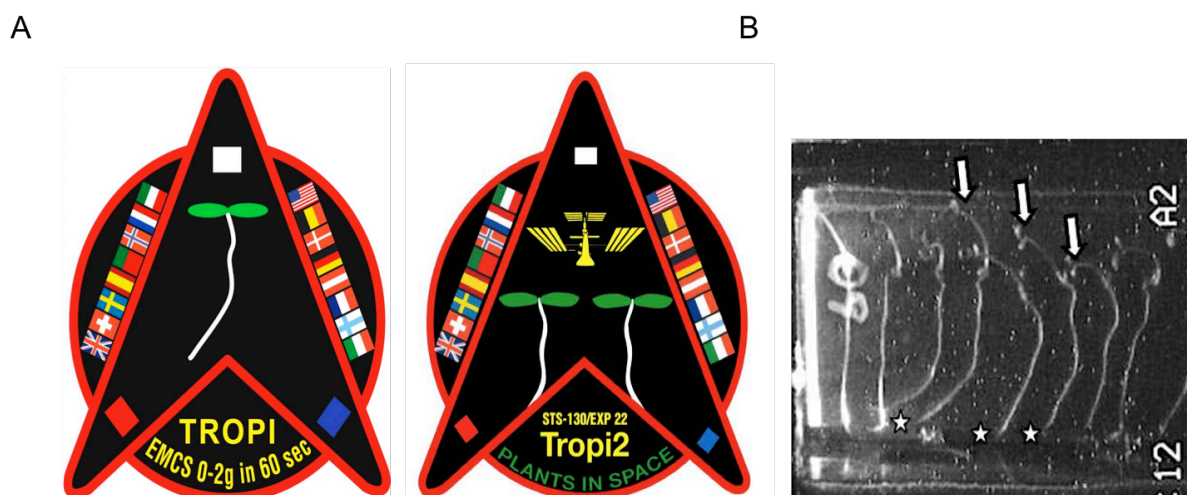
**Figura 22. Resultados del experimento llevado a cabo en la RPM con fotoestimulación con luz roja.** A) La longitud de la raíz solo fue mayor en la condición experimental (microgravedad simulada) respecto a su correspondiente control 1g en las plantas de los genotipos WT y *phyB* cuando eran sometidas los dos últimos días de su periodo de crecimiento a oscuridad. B) La proliferación celular (nº células/mm) en el meristemo radicular de las plantas WT y el mutante *phyB* fue mayor en microgravedad simulada cuando eran sometidas a oscuridad, pero menor cuando crecieron con luz roja. El mutante *phyA*, en cambio, mostró un comportamiento contrario siendo su proliferación menor en oscuridad y aumentando con la luz roja. C) El área del nucléolo fue menor (estadísticamente significativo en *phyA* y *phyB*) en los tres genotipos estudiados tras crecer los dos últimos días en oscuridad y mayor cuando son fotoestimulados con luz roja al comparar con sus correspondientes controles 1g (mismas condiciones lumínicas). D) El estudio de la proliferación y crecimiento celular mediante la expresión de genes (qRT-PCR) marcadores de estos dos procesos mostró en presencia de luz roja una reversión de los cambios de expresión obtenidos en oscuridad.

Adaptado de Valbuena et al. 2018.

### 3.1.3. Experimento “TROPI”

El experimento TROPI (*Analysis of a novel sensory mechanism in root phototropism*), dirigido por el Dr. John Kiss, fue desarrollado para estudiar la interacción de la gravedad y la luz en el crecimiento de las plantas y, en general, obtener una visión de los mecanismos celulares y moleculares de los tropismos (Molas y Kiss 2009; Vitha et al. 2000).

Este experimento se ejecutó en la ISS utilizando el incubador EMCS (*European Modular Cultivation System*) para el que la NASA desarrolló unas cámaras de cultivo o cassettes que se insertan en los contenedores experimentales (ECs) del EMCS, dotados de un sistema de hidratación semi-automático, un sistema de iluminación por LEDs blancos, rojos y azules y un sistema anti-condensación para permitir el registro videográfico del interior del cassette mediante el equipo del EMCS instalado para este fin. Estos cassettes se denominaron “Tropi”, como el experimento para el que se diseñaron. Se utilizaron plántulas silvestres de *Landsberg erecta* y líneas mutantes de fitocromos, *phyA-201*, *phyB-1* y *phy210 phyB-1*. La respuesta fototrópica de estas plantas hacia la iluminación con luz azul y roja fue estudiada en condiciones de microgravedad real, niveles parciales de gravedad y control 1g, los dos últimos producidos en el espacio mediante la centrífuga que posee el EMCS. EL EMCS es un dispositivo que proporciona una atmósfera y temperatura controlada, y que, junto con un control 1g a bordo y dispositivos de captura de imagen que permiten la toma de decisiones en tierra en caso de anomalías durante la misión espacial, mejoran sensiblemente el control de las condiciones experimentales en contraste con el experimento ROOT. Además, constó de dos fases o vuelos espaciales: TROPI I realizado entre octubre y diciembre de 2006 y TROPI 2 realizado entre febrero y marzo de 2010 (FIGURA 23A)(Kiss et al. 2009).



**Figura 23. Experimento TROPI.** A) Parches de los experimentos TROPI 1 y TROPI 2. B) Respuesta fototrópica positiva de tallos (flechas) y raíces (estrellas) hacia la luz roja unidireccional (LEDs rojos situados en el lateral izquierdo del cassette).

Adaptada de Kiss 2012.

El desarrollo de TROPI 1 tuvo varios problemas que hicieron que los resultados obtenidos fueran muy escasos. El sistema de video para seguir y analizar el crecimiento era analógico, lo que no permitió observar problemas de hidratación de algunos *cassettes* e implicaba un análisis de imágenes post-vuelo muy complejo. El porcentaje de germinación fue muy bajo, aproximadamente 58%, debido al largo periodo de almacenamiento de las semillas hasta su hidratación en condiciones de vuelo, en presencia de gases tóxicos resultantes de la evaporación de los productos utilizados en la construcción de los *cassettes*. Además, el RNA obtenido de las muestras congeladas resultó no ser de calidad suficiente para realizar técnicas transcriptómicas avanzadas (microarrays) (Kiss et al. 2007b, 2009).

En la segunda fase del experimento, TROPI 2, todos estos problemas se solucionaron al incorporar un sistema de video a tiempo real, limitar el tiempo de almacenamiento de las semillas a 6 meses, instaurar un protocolo eficiente de *off-gassing* y ventilación de los *cassettes* tras su fabricación y añadir un filtro de carbón activo en la cubierta del *cassette* para filtrar los gases acumulados en la ISS, como el etileno, que inhibe el crecimiento. Por último, el tiempo de transferencia de los *cassettes* a la cápsula se redujo a menos de 3 min por la incorporación de un segundo astronauta en el procedimiento y la utilización del congelador GLACIER (Kiss et al. 2011).

El experimento TROPI finalmente obtuvo resultados satisfactorios, como la descripción de una nueva respuesta fototrópica positiva a la luz roja en los hipocotilos y raíces en

microgravedad real similar a la que manifiestan los musgos y helechos en la tierra. Esta respuesta fototrópica que no existe en plantas superiores en gravedad terrestre ( $1g$ ), en *Arabidopsis thaliana*, aparece gradualmente a medida que disminuye el nivel de gravedad (FIGURA 23B). También se observó que un pretratamiento con luz roja antes de la fotoestimulación con luz azul producía una reducción en la respuesta de los hipocotilos, pero un aumento en la de las raíces (Kiss et al. 2012; Millar et al. 2010).

### 3.1.4. Experimento “Seedling Growth”

Los resultados obtenidos en los experimentos espaciales ROOT y TROPI, más los resultados complementarios en microgravedad simulada, indujeron a los dos investigadores principales, el Dr. Francisco Javier Medina y el Dr. John Kiss, a diseñar un experimento conjunto de mucha mayor complejidad con el objetivo principal de entender los mecanismos básicos de respuesta a la luz y a la gravedad en las plantas. En concreto, los objetivos generales que se plantearon para el nuevo proyecto fueron, el conocimiento de los mecanismos de percepción, transducción y respuesta de las plantas a las señales lumínicas y gravitatorias en el ambiente espacial de microgravedad y la identificación de los efectos combinados de estas señales sobre el crecimiento celular, la proliferación y el ciclo celular.

El Proyecto se dividió en tres fases, cada una de las cuales implicó un vuelo espacial independiente y un número variable de experimentos separados, llevados a cabo de forma sucesiva. Todos los experimentos se realizaron en el módulo “Columbus” de la ISS, utilizando el “European Modular Cultivation System” (EMCS), dotado del “hardware” específico “TROPI” para albergar las semillas que germinaron para el crecimiento de plántulas durante seis días con distintos regímenes de iluminación y distintos niveles de gravedad ( $\mu g$  real,  $0,1g$ ,  $0,5g$ ,  $0,8g$  y  $1g$ ). De las distintas fases del proyecto, la primera (SG1) se llevó a cabo en la ISS en marzo-mayo de 2013, la segunda (SG2) en noviembre-diciembre de 2014 y la tercera (SG3) en junio-julio de 2017 (FIGURA 24).

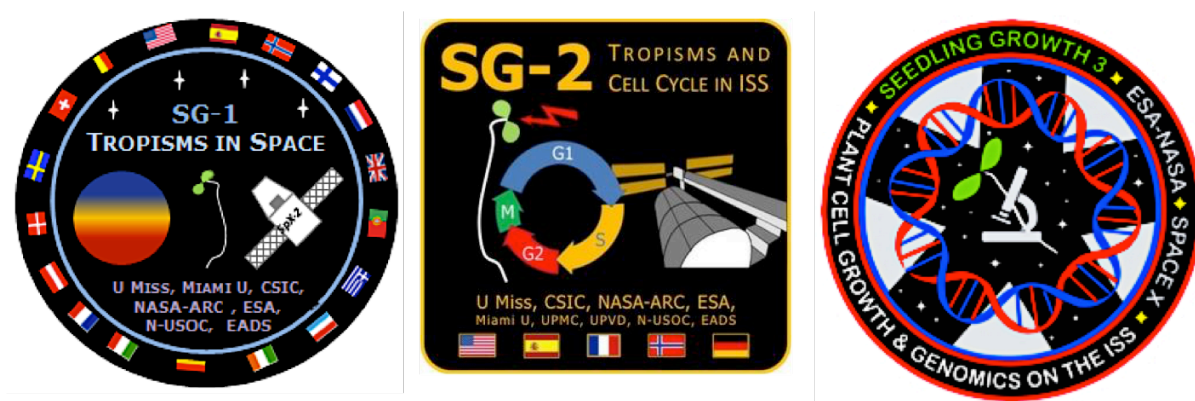


Figura 24. Parches de los experimentos “Seedling Growth 1”, “Seedling Growth 2” y “Seedling Growth 3”.

Además, se utilizó una amplia batería de líneas de plántulas de *Arabidopsis thaliana*: dos líneas silvestres (ecotipos “Columbia” y *Landsberg erecta*), líneas mutantes de fitocromos (*phyA-201* y *phyB-1*), líneas mutantes en la percepción y transporte de auxinas (*aux1.7*, *eir1.1* y *tir*), líneas mutantes de la biogénesis de ribosomas (*nuc1.2* y *nuc2.2*) y dos líneas transgénicas reporteras (*DII-VENUS* y *CYCB1;1:uidA*).

Los conocimientos obtenidos de este experimento se presumían críticos para saber cuál es la mejor forma de usar o cultivar plantas como parte de los Sistemas de Soporte Vital necesarios para la exploración y colonización humana de la Luna y Marte y en un futuro más lejano en los viajes fuera de nuestro Sistema Solar. En este contexto se plantearon los objetivos y experimentos recogidos en la presente Memoria.

# OBJETIVOS

## Objetivos

La presente Tesis Doctoral se plantea a partir de los resultados obtenidos en nuestro laboratorio en el estudio de los efectos de la microgravedad real y simulada sobre la proliferación y el crecimiento celular, procesos básicos del desarrollo de las plantas, y en el contexto del proyecto espacial “Seedling Growth” y las actividades experimentales complementarias. El objetivo central de esta Tesis es conocer los mecanismos de percepción, transducción y respuesta de las plantas a las señales lumínicas y gravitatorias en un ambiente de microgravedad y la identificación de los efectos combinados de estas dos señales sobre el crecimiento y la proliferación celular.

Para alcanzar este objetivo principal se han planteado los siguientes objetivos secundarios:

1. Caracterizar el efecto estimulador de la irradiación con luz roja sobre la competencia meristemática de la raíz, tanto en ausencia de gravedad como en la gravedad presente en la superficie de Marte. Para ello se analizará el desarrollo de distintas líneas de plantas de *Arabidopsis thaliana*, crecidas durante las tres fases del experimento espacial *Seedling Growth*, mediante parámetros que indiquen la coordinación entre proliferación y crecimiento celular en el meristemo radicular (competencia meristemática), condición imprescindible para que la planta crezca y se desarrolle adecuadamente. En concreto, se estudiarán los siguientes parámetros:
  - Definir cambios en la longitud de las raíces.
  - Conocer, en la raíz, cambios en la expresión de genes marcadores del estatus de competencia meristemática de la punta de la raíz, por ser claves para la regulación de la proliferación y crecimiento celular, así como de la percepción y transporte de auxinas.
  - Identificar alteraciones en la expresión génica mediante el análisis transcriptómico a nivel de genoma completo.

- Definir las alteraciones a nivel celular en los parámetros utilizados como indicadores de la regulación de proliferación y crecimiento celular y en el patrón de distribución de auxinas.
2. Conocer el efecto conjunto del estímulo gravitrópico y lumínico en el crecimiento de las plantas en los primeros días de su desarrollo y en qué medida la luz, como señal orientadora de crecimiento, contrarresta de modo global los efectos causados por la falta de gravedad. Este efecto conjunto se estudiará comparando parámetros indicativos de crecimiento, proliferación celular y transporte de auxinas en plantas crecidas en microgravedad simulada (RPM) con fotoperiodo (16h luz blanca/8h oscuridad) o en oscuridad, frente a plantas crecidas con el mismo régimen lumínico, pero a gravedad terrestre (control 1g).
- Identificar cambios en la dirección de crecimiento y en la longitud de los tallos y raíces.
  - Conocer los efectos sobre el mecanismo molecular de la biogénesis de ribosomas en tallos y raíces mediante el estudio del procesamiento del pre-rRNA 45S.
  - Definir las alteraciones celulares con implicación funcional relacionadas con la regulación del ciclo celular (proliferación celular) y con la biogénesis de ribosomas (crecimiento celular) en el meristemo radicular.
  - Identificar cambios en la expresión génica de genes marcadores de proliferación, crecimiento celular y transporte de auxinas en la raíz.
  - Establecer cambios en el patrón de distribución de auxinas en el meristemo radicular.
3. Avanzar en los estudios previos en microgravedad real (experimento ROOT) y simulada (RPM y levitador magnético) para conocer si magnitudes de gravedad fraccional, como las presentes en la Luna (0,17g) y Marte (0,38g), alteran de la misma manera la competencia meristemática de la raíz.
- Validación biológica de la tecnología en desarrollo (RPM) utilizando distintas líneas de plantas de la especie modelo *Arabidopsis thaliana*. Esta validación es



necesaria para alcanzar uno de los objetivos más inmediatos de la exploración humana del espacio, la realización de viajes fuera de la Tierra de larga duración. Para ello se utilizarán dos paradigmas de simulación de niveles parciales de gravedad por modificación del modo regular de funcionamiento de la RPM. La comparación con los estudios anteriores se llevará a cabo por la realización de las mismas técnicas, medición de los mismos parámetros y mismas condiciones de crecimiento (oscuridad y medio suplementado con sacarosa) utilizados anteriormente.

- Determinar el valor “umbral” del vector gravedad necesario para desencadenar la respuesta gravitrópica.
4. Optimizar los procedimientos técnicos necesarios a emplear en el experimento espacial *Seedling Growth 3* y definir la secuencia óptima de pasos a seguir durante su ejecución, para la realización con éxito del experimento y la obtención de muestras suficientes, adecuadamente preservadas para su posterior análisis:
- Establecer el tiempo máximo y condiciones de almacenamiento de las semillas, desde su montaje en la cámara de cultivo (*cassette*) hasta su hidratación en el EMCS, para asegurar tasas altas de germinación.
  - Validar el dispositivo denominado Fixbox para la fijación química en el espacio de las muestras biológicas contenidas en *cassettes* del EMCS, mediante la inyección de fijador en su interior:
    - Adaptar la cámara de cultivo (*cassette*) para ser llenada con el máximo volumen posible de solución fijadora, sin que se produzcan fugas.
    - Determinar el tiempo máximo de preparación y condiciones de almacenamiento de las soluciones fijadoras hasta el llenado de los *cassettes* con el dispositivo Fixbox, para que no se produzcan daños estructurales en el tejido vegetal.
    - Determinar el tiempo máximo y la temperatura a la que las muestras pueden estar inmersas en solución fijadora.

- Explorar un método para garantizar que las plántulas permanezcan inmersas en la solución fijadora en condiciones de microgravedad. Estudiar posibles problemas de biocompatibilidad y de calidad de fijación.
  - Definir las condiciones de transporte de las muestras congeladas y fijadas para su retorno a la Tierra (temperatura, tiempo, procesamiento).
5. Establecer el efecto de la radiación en dosis equivalentes a las presentes en el interior de la ISS (0,4 mGy/día), junto con la falta de gravedad, en la competencia meristemática de la raíz. Este efecto se estudiará en plantas de distintas líneas de *Arabidopsis thaliana* en una instalación que irradia las muestras y en la que es posible introducir la RPM y el soporte del control 1g. En concreto, se estudiarán en la raíz cambios a nivel celular en los parámetros indicadores de la competencia meristemática y el patrón de distribución de la fitohormona auxina.



# **MATERIAL Y MÉTODOS**

**1. Material biológico**

**2. Experimento “Seedling Growth”**

**3. Experimentos realizados en instalaciones de Simulación de Microgravedad en Tierra (Ground Based Facilities, GBF) europeas**

**4. Técnicas de microscopía**

**5. Técnicas transcriptómicas**

**6. Análisis Estadístico**

# Material y Métodos

## 1. Material biológico

Los experimentos incluidos en este trabajo se realizaron utilizando la especie vegetal modelo *Arabidopsis thaliana*. Se utilizaron distintas líneas mutantes o portadoras de construcciones genéticas reporteras, basadas en dos de los ecotipos caracterizados en esta especie, que se presentan clasificadas en función del proceso afectado (Kranz 1987):

- Colección de líneas para el estudio del fototropismo:

- *Landsberg erecta*: ecotipo de genotipo silvestre o *wildtype* denominado Ler, que fue la base genética sobre se obtuvieron los mutantes de fitocromos.
- *phyA-201 (phyA)*: línea mutante deficiente en la expresión y actividad de la proteína fitocromo A (PHYA, AtG09570), al producirse la sustitución de una citosina por una timina, por mutagénesis con metanosulfonato de etilo, cambiando un codón glutamina por un codón stop en el aminoácido 980. Esta línea mutante anteriormente se le denominaba *fre1-1 (far red elongated mutant)* (Reed et al. 1994).
- *phyB-1 (phyB)*: línea mutante deficiente en la expresión y actividad de la proteína fitocromo B (PHYB, AtG18790), al producirse por mutagénesis con metanosulfonato el cambio de un codón glutamina por un codón stop en el aminoácido 448, por la sustitución de una citosina por una timina en el nucleótido de la posición 3640. Este mutante también recibe el nombre de *phyB-Bo64* (Reed et al. 1993).

- Colección de líneas para el estudio del transporte y recepción de auxinas:

- Columbia: ecotipo de genotipo silvestre o *wildtype* denominada Col-0, que fue también la base genética sobre la que se obtuvieron los demás mutantes y líneas reporteras utilizadas en esta tesis (excepto las señaladas en el apartado anterior con base Ler).
- *aux1.7*: línea mutante deficiente en la proteína transportadora del flujo de entrada de auxinas en la célula AUX (AtG38120) obtenida por mutagénesis por metanosulfonato de etilo (Maher y Martindale 1980). Esta línea mutante presenta resistencia a auxina y etileno en la raíz, además, de ser ésta agravitrópica (Pickett et al. 1990).
- *eir1.1*: línea mutante deficiente en la proteína transportadora de flujo de salida de auxinas de la célula PIN2 (AtG57090). La mutación ha sido aislada de un *pool* de plantas mutagenizadas por diepoxibutano. Esta mutación produce raíces insensibles al etileno y con una respuesta gravitrópica alterada (Roman et al. 1995).
- *tir1*: línea mutante deficiente en el receptor de auxinas TIR (At3G62980) obtenida por la inserción de un T-DNA en su primer intrón (Ruegger et al. 1998; Feldmann 1991).
- DII-VENUS: línea portadora de una construcción genética reportera de la ausencia de auxina (basada en la degradación de Aux/IAA catalizada por el complejo de ubiquitinación SCF<sup>TIR/AFB1-5</sup> en presencia de auxina). La construcción está formada por la fusión de la proteína amarilla fluorescente (*yellow fluorescent protein*, YFP) de rápida maduración VENUS, que posee una señal de localización nuclear, en fase con el dominio DII de la proteína Aux/IAA bajo el promotor constitutivo 35S. Esto permite monitorizar la degradación de Aux/IAA (DII) a la vez que se pierde la señal de fluorescencia, por lo que se relaciona inversamente con la abundancia de hormona (Brunoud et al. 2012).

- Colección de líneas para el estudio del crecimiento celular y biogénesis de ribosomas:

- *nuc1.2* (*nuc1*, SALK\_002764): línea mutante deficiente en la proteína nucleolar nucleolina 1 (NUC1, At1G48920) por la inserción de T-DNA de 114 nucleótidos en el exón 9 (Alonso et al. 2003; Petricka y Nelson 2007). Este mutante también es conocido con los nombres *parl1-2* y  $\Delta 27$ .
- *nuc2.2* (*nuc2*, GABI178D01): línea deficiente en la expresión y actividad de la proteína nucleolar nucleolina 2 (NUC2, At3G18610) por la inserción de un T-DNA de 423 nucleótidos en un exón del gen (Rosso et al. 2003; Durut et al. 2014).

- Colección de líneas para el estudio de la proliferación celular:

- *CYCB1;1:uidA*: línea transformada con una construcción formada por un inserto del gen reportero GUS bajo el control del promotor de la ciclina B1 (CYCB1, At4G37490.1) (Ferreira et al. 1994), facilitada por la Dra. Eugénie Carnero-Díaz (Sorbonne Université “Pierre et Marie Curie”, Paris VI, Francia).

## 2. Experimento “Seedling Growth”

El experimento espacial “Seedling Growth” es un proyecto conjunto de las dos agencias espaciales más importantes, la NASA (*National Aeronautics and Space Administration*) y la ESA (*European Space Agency*). La propuesta se presentó al *International Life Sciences Research Announcement* (ILSRA) en 2.009. En realidad, se presentaron dos propuestas que fueron aprobadas, una liderada por un Investigador Principal americano, el Dr. John Kiss (ILSRA-2009-1177), y la otra, presentada por nuestro laboratorio, liderada por un Investigador Principal europeo, el Dr. Francisco Javier Medina (ILSRA-2009-0932). El Comité Científico Internacional que evaluó la convocatoria recomendó la fusión de las dos propuestas. Tras el acuerdo de las dos agencias, ambos Investigadores adaptaron sus objetivos para combinar sus estudios y maximizar, de esta manera, los resultados científicos a obtener.

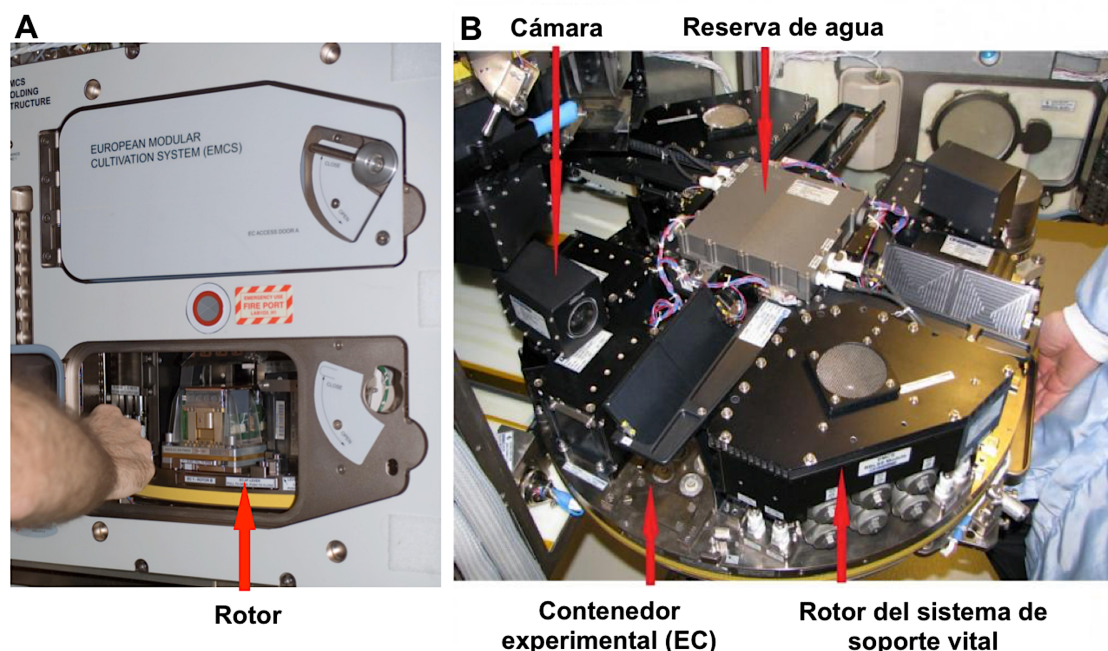
Este experimento se desarrolló en tres fases, cada una de las cuales, requirió de un vuelo espacial independiente, que fueron: *Seedling Growth 1* (SG1, IP Dr. Kiss) lanzado en la misión SpaceX-2 en marzo de 2013, *Seedling Growth 2* (SG2, Co-IPs Dr. Kiss /Dr. Medina) lanzado en el SpaceX-4 en septiembre de 2014 y *Seedling Growth 3* (SG3, IP Dr. Medina) lanzado exitosamente en la misión SpaceX-11 en junio de 2017.

La actividad experimental se desarrolló en el módulo “*Columbus*” de la Estación Espacial Internacional (ISS) utilizando para ello un *hardware* o dispositivo específico, *European Modular Cultivation System* (EMCS) especialmente diseñado para el crecimiento de pequeñas plantas, instalado con anterioridad en el mencionado módulo (FIGURA 25). El EMCS es un incubador, controlado telemáticamente desde el Centro de soporte de usuarios y operaciones noruego (*Norwegian User Support and Operations Centre*, N-USOC, Trondheim, Noruega), capaz de hidratar las semillas para promover su germinación y de mantener las condiciones atmosféricas controlando la temperatura, la humedad y la concentración de O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y etileno, durante la germinación y el desarrollo de plántulas jóvenes. Además posee dos centrifugas independientes (Rotor A y Rotor B) que permiten crear condiciones de gravedad a voluntad, que van desde 0g (microgravedad real), cuando están paradas, hasta un máximo de 2g cuando giran a su máxima velocidad (en revoluciones por minuto, rpm), incluyendo la gravedad terrestre 1g para la realización de controles. También este dispositivo capta videos e imágenes a tiempo real, lo que permite supervisar el desarrollo del experimento y conocer si ocurre algún problema, como es la incorrecta hidratación de las muestras (Brinckmann 1999, 2005; Kiss et al. 2009).

El EMCS puede albergar hasta cuatro contenedores experimentales o ECs (*Experimental Container*), los cuales proporcionan la iluminación a las muestras, al poseer LED blancos en la parte superior y LED rojos y azules en un lateral, pudiendo cambiar la calidad (longitud de onda) y la duración de ésta dependiendo de las necesidades de cada experimento.



A su vez cada EC contiene cinco cassettes o cámaras de cultivo (CC), dónde se encuentran las semillas y el medio de cultivo necesario para la germinación de éstas y el crecimiento de las plántulas (Correll et al. 2005).

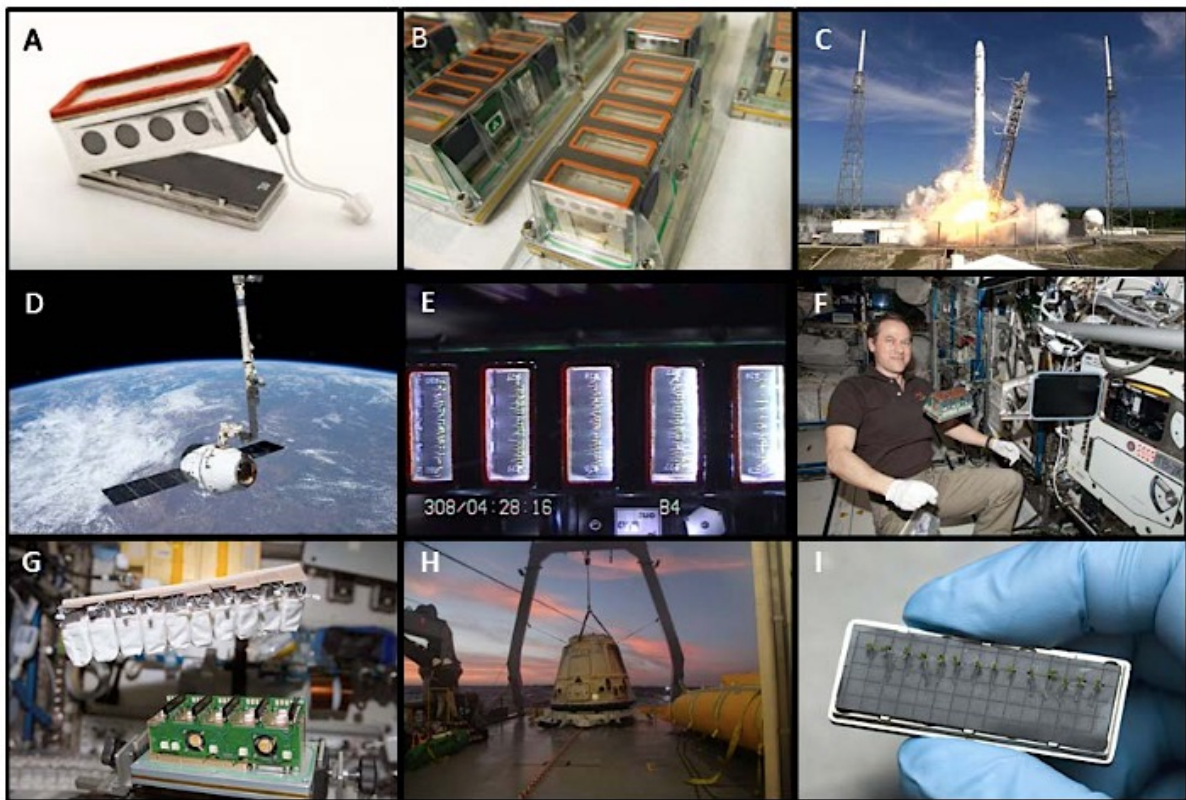


**Figura 25. Fotografías del EMCS (European Modular Cultivation System).** A) Fotografía del exterior del hardware mostrando los dos rotores independientes. B) Interior del dispositivo señalando las partes más importantes para el desarrollo del experimento.

Cada experimento espacial comienza en el centro de investigación AMES de la NASA (Ames Research Center, ARC, Mountainview, California, USA) donde se lleva a cabo la preparación y montaje de los cassettes y su ensamblado en los ECs (FIGURA 26). Después el hardware montado es transportado hasta el Kennedy Space Center (KSC, Cabo Cañaveral, Florida) donde se instala en el vehículo espacial (cápsula “*Dragon*” de SpaceX). La cápsula es lanzada hacia la ISS utilizando un cohete Falcon 9 (SpaceX) reutilizable. Una vez en la ISS, los ECs son almacenados hasta que el astronauta tiene autorización para colocarlos en el EMCS. Durante todo este el tiempo las semillas se mantienen secas en estado de dormancia hasta que los controladores del N-USOC verifican que el EMCS está operativo y la tripulación instala los correspondientes ECs en el EMCS. En este momento, comienza la secuencia temporal del experimento con la hidratación de los cassettes controlada por el N-USOC, y además, en este momento, también se calibra la cámara (Sony FCB-IX470). Durante el periodo de crecimiento de las plántulas se toman imágenes para analizar su crecimiento y desarrollo, que son de baja resolución de cada cassette completo a los tiempos 0h, 63h, 72h, y 87h después de

la hidratación y de alta resolución de cada mitad de cada cassette cada 60 minutos entre las 96h y 144h después de la hidratación.

Transcurrido el periodo de crecimiento de las plántulas (144h o 6 días) los astronautas extraen los ECs y los colocan en la “Coldbag” para su congelación y almacenamiento a -80°C en la instalación MELFI (*Minus Eighty-Degree Laboratory Freezer for ISS*) o los introducen en el dispositivo denominado *FixBox* para su fijación química durante 3h a temperatura ambiente. Las muestras congeladas vuelven a Tierra en el GLACIER (*General Laboratory Active Cryogenic ISS Experiment Refrigerator*) (congelador instalado en la cápsula espacial de transporte) siempre asegurándose una temperatura menor a -68°C y las muestras fijadas vuelven a una temperatura comprendida entre 4°C y 6°C. Tras el amerizaje de la cápsula “Dragon” las muestras son recogidas de la costa de California y transportadas a AMES donde se almacenan a la misma temperatura hasta que son procesadas por el equipo del Investigador Principal (Vandenbrink y Kiss 2016).



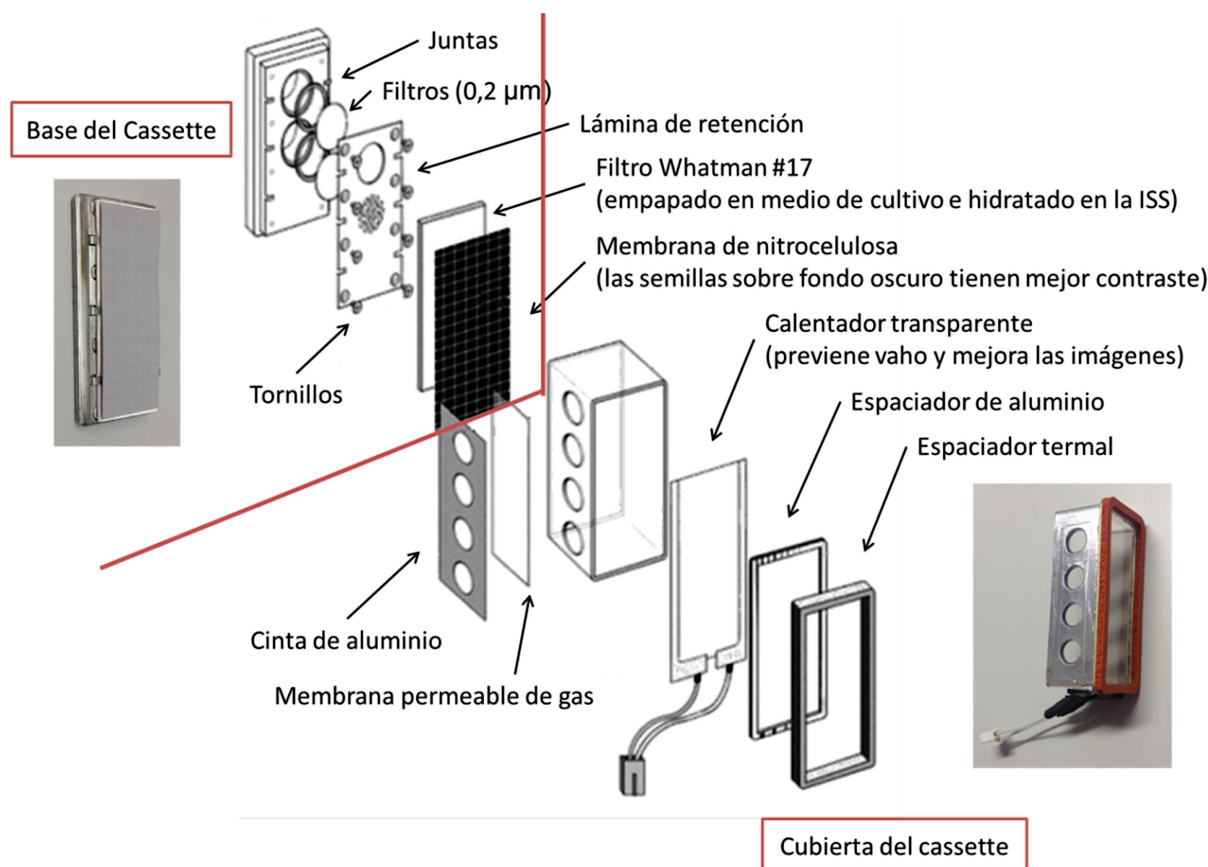
**Figura 26. Resumen gráfico de las operaciones en el experimento espacial SG.** A) Ensamblaje de los cassettes antes de ser cerrados con la cubierta. B) Montado de los cassettes en los ECs. C) y D) Transporte a KSC, carga en la cápsula “Dragon” y acoplamiento de ésta en la ISS. E) Imagen de la etapa de germinación y crecimiento de las plántulas. F) Extracción de las muestras del EMCS transcurrido el periodo de crecimiento de las plántulas. G) Colocación de los cassettes en la “coldbag” para su congelación en MELFI. H) Recogida de las muestras tras el amerizaje de la cápsula en el Océano Pacífico. I) Procesado de las muestras en Tierra por el equipo del Investigador Principal para sus posterior análisis.

## 2.1. Montaje de los cassettes CC

El montaje y ensamblado de las cámaras de cultivo o cassettes es un paso clave para el éxito del experimento espacial por lo que se realiza siguiendo el protocolo estipulado y supervisado por el personal de la NASA. Cada cassette está constituido por dos piezas principales: la base y la cubierta ([FIGURA 27](#)).

La base tiene forma rectangular con dos orificios, correspondientes a los puertos de temperatura y de hidratación por donde son ensamblados al EC, sobre los que se colocan dos juntas de silicona (Fisher Scientific#SX0001301) y dos filtros (*Millipore Filter*, Fisher Scientific#GSWP01300). Encima de éstos dos últimos se fija la lámina de retención con tornillos, la cual posee unas pestañas donde se coloca un papel de cromatografía (Whatman 17 CHR, Fisher Scientific#3017-915) prensado e impregnado en medio de cultivo. Por último, se coloca una membrana cuadriculada de nitrocelulosa (VWR#28149-472) donde previamente se han colocado las semillas.

La cubierta, prismática, abierta por una de las caras, está formada por 5 caras de metacrilato. Una de las caras laterales posee cuatro ventanas tapadas por una membrana que permite el intercambio de gases y la entrada de la luz blanca. Una de sus caras contiguas es transparente para permitir la entrada de la luz roja o azul, mientras que la de enfrente es negra para evitar la contaminación lumínica entre cassettes. En su cara superior posee un sistema de calentamiento eléctrico para evitar la condensación de vapor de agua en el interior del cassette y poder tomar las imágenes con claridad, que se conecta con el EC por los cables de la última cara de la cubierta (Correll et al. 2005; Kiss et al. 2009).



**Figura 27. Esquema de todos los componentes del cassette espacial y su orden de ensamblado.** En la figura se han separado los componentes de las base (parte superior) y de la cubierta (parte inferior) y se ha adjuntado una foto de cada una de las partes ensambladas por separado antes del cierre de los cassettes.

### 2.1.1. Esterilización de las cubiertas

La esterilización de las cubiertas se realizó en la campana de flujo laminar, donde se colocaron tres vasos de precipitado estériles ( $121^{\circ}\text{C}$  durante 20 min) cada uno de ellos con una de las siguientes etiquetas: “Sterilization”, “Rinse#1” y “Rinse#2”. El vaso etiquetado como “Sterilization” fue llenado con la solución de esterilización, que es una disolución de etanol 70% (v/v) (Sigma#270741) con dos gotas de Tritón-X100 (Sigma#T9284) por cada 500ml de etanol y los marcados como “Rinse#1” y “Rinse#2” fueron llenados con etanol 100%. A continuación, se introdujeron en la solución de esterilización como máximo cuatro cubiertas para asegurar que quedaran totalmente sumergidas, y el recipiente entero fue sometido a sonicación durante 10 segundos para eliminar las burbujas. Las cubiertas se mantuvieron durante 15 minutos en esta solución agitándose de forma continua con unas pinzas estériles. Transcurrido este tiempo las cubiertas, de una en una, fueron transferidas durante 10 segundos y en



continua agitación al recipiente marcado como “*Rinse#1*” y de ahí al recipiente “*Rinse#2*” repitiéndose el mismo proceso. Por último, las cubiertas se colocaron sobre un papel de filtro estéril y se dejaron secar al menos 30 minutos. Una vez secas, pueden ser almacenadas en un recipiente estéril hasta 3 meses.

### 2.1.2. Preparación medio de cultivo y papel Whatman

El medio de cultivo utilizado en el experimento espacial está basado en el medio definido por *Murashige and Skoog*, pero a mitad de concentración (1/2 MS) y sin complementar con sacarosa para evitar la contaminación por microorganismos (Kiss et al. 2011). El medio estuvo compuesto por 50ml de macronutrientes (Sigma M0654), 50ml de micronutrientes (Sigma M0529), 0,1661±0,005g de MES hidratado (Sigma M2933) y 0,0381±0,005g de MESK<sup>+</sup> (Sigma M0895) en 900ml de H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> (Sigma#W3500). A continuación, el pH de la mezcla en agitación fue medido y ajustado con una solución KOH 1M (Sigma#221473) hasta alcanzar un valor estable de 5,50±0,05 y un volumen final de 1l.

El siguiente paso fue cortar el papel Whatman (Whatman 17 CHR, Fisher Scientific#3017-915) con unas dimensiones de 4,75x1,63cm (±0,03) y empaparlos en medio de cultivo hasta saturación. Por último, se dejaron en la campana de flujo laminar sobre una superficie no absorbente al menos 2,5 horas hasta su secado total.

### 2.1.3. Montado de las semillas

La preparación de las semillas consta de la esterilización de las mismas y de su sembrado en la membrana de nitrocelulosa.

#### 2.1.3.1. Esterilización de las semillas

Este proceso comenzó con el llenado de un vaso de precipitados estéril etiquetado como “70% *Ethanol+Triton*” con la solución de esterilización (etanol 70% (v/v) con Tritón-X100) y de un segundo vaso etiquetado como “*Rinse Alcohol*” con etanol 100%. A continuación, se introdujeron en un vial estéril las semillas a esterilizar y con una pipeta *Pasteur* estéril (VWR#14672-410) se añadieron tres volúmenes de la solución de

esterilización y después de 5 minutos agitando suavemente el vial con la mano la solución fue absorbida. Por último, se realizaron dos lavados de 1 minuto cada uno añadiendo al vial tres volúmenes de etanol 100% y agitando durante todo el tiempo. Después del segundo lavado, se añadió una pequeña cantidad de etanol 100% para absorber con la pipeta las semillas y dejarlas secar en un papel de filtro estéril al menos 1 hora. Cuando las semillas estériles estuvieron completamente secas se continuó con su sembrado. Este proceso fue repetido para cada genotipo utilizado en el experimento.

#### 2.1.3.2. Sembrado de las semillas

El primer paso fue cortar las membranas de nitrocelulosa (VWR#28149-472) con las dimensiones correspondientes de 4,60x1,63cm ( $\pm 0,03$ ) y etiquetarlas en ambos extremos con el número de cassette especificado en el mapa EC o EC *map* (mapa o esquema que determina la posición de cada genotipo en cada cassette de cada EC), utilizando para ello una tinta blanca hidrófoba (*Koh-I-Noor Dye-Based Drawing Ink, White#9065-D*) cuya inocuidad biológica fue testada previamente por NASA.

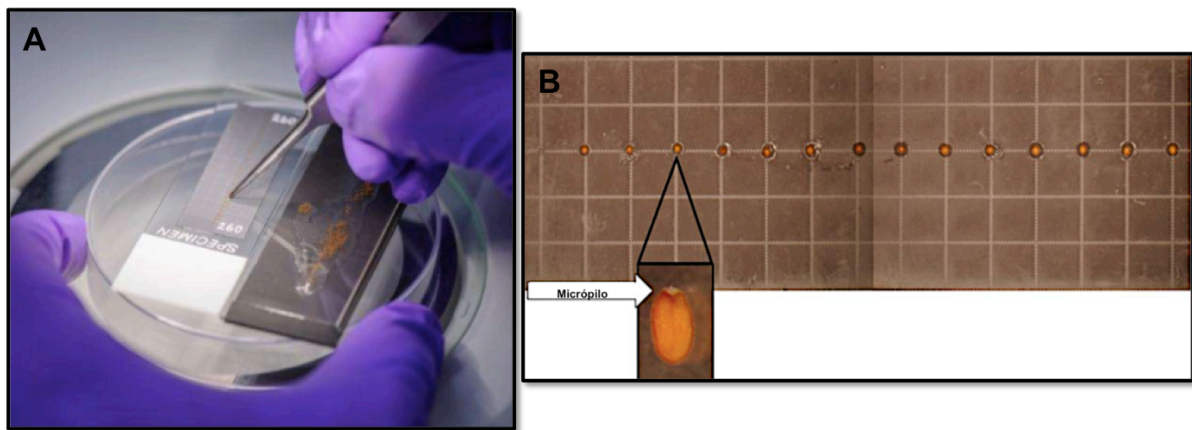
El siguiente paso fue la preparación de la solución con la que se fijaron las semillas a la membrana de nitrocelulosa. Esta solución es una disolución al 1% (p/v) de Goma Guar (Sigma#G-4129) en H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> (Sigma#W3500) y calentada en un agitador magnético hasta llegar a su ebullición.

Una vez preparadas las membranas y la solución de Goma Guar, éstas fueron esterilizadas a 121°C durante 20 min.

El último paso fue fijar o sembrar las semillas en la membrana de nitrocelulosa, para lo que se utilizó la solución al 1% (p/v) de Goma Guar estéril (sustancia testada y demostrada su no toxicidad sobre las semillas). Este paso es el más importante en el montado del cassette porque es imprescindible conseguir un porcentaje de germinación elevado y por ello se realizó una selección de semillas exhaustiva. La selección de las semillas se llevó a cabo colocando una superficie de plástico o cristal estéril (Placa Petri) bajo la lupa (Leica EZ4) y sobre ella dos portaobjetos estériles. En uno de los portaobjetos fue colocada la membrana de nitrocelulosa estéril y en el otro (con papel negro para aumentar el contraste) una pequeña cantidad de Goma Guar (1%) donde a su vez se depositaron las semillas. A continuación, se seleccionaron las semillas necesarias para cada membrana (número y genotipo determinado por el mapa EC) y se

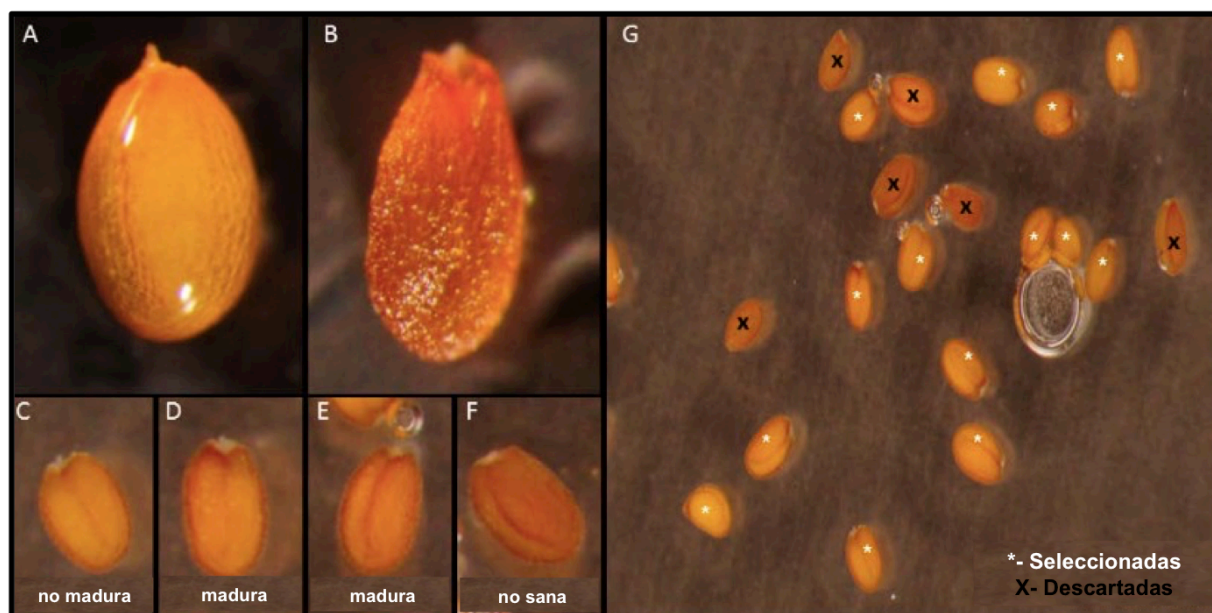
colocaron de una en una, con unas pinzas flameadas y con una cantidad mínima de Goma Guar, en la membrana previamente hidratada con  $H_2O_{dd}$  (Sigma#W3500) con el micrópilo hacia arriba (FIGURA 28).

Por último, las membranas sembradas se dejaron secar en papel de filtro estéril en la campana de flujo laminar al menos 15 minutos. Cuando estuvieron totalmente secas se almacenaron en una Placa Petri de cristal estéril en la misma campana hasta que fueron montadas en la base correspondiente.



**Figura 28. Sembrado de semillas en la correspondiente membrana de nitrocelulosa.** A) Imagen del proceso de selección de semillas en la lupa, mostrándose el portaobjetos (izquierda y sin papel negro debajo) con la membrana en la que se colocan las semillas y el portaobjetos (derecha y con papel negro debajo) con las semillas en Goma Guar. B) Imagen de una membrana sembrada con semillas seleccionadas y un aumento para mostrar como el micrópilo es colocado hacia arriba.

Es muy importante seleccionar bien las semillas para que su germinación y crecimiento sea óptimo en la ISS y el material biológico sea suficiente para su posterior análisis. El criterio de selección se basa especialmente en su morfología, color y tamaño. Las semillas seleccionadas fueron aquellas que estaban maduras, con un tamaño medio y un color marrón claro, descartándose las que presentaron una forma anormal (no redondeada), un color marrón oscuro o que estaban inmaduras (amarillo-verdosas) (FIGURA 29) (Vandenbrink y Kiss 2016).



**Figura 29. Selección de semillas para el experimento “Seedling Growth”.** A) Semilla que cumple los criterios para ser seleccionada al presentar una forma redondeada, un tamaño medio, un color marrón claro y estar madura. B) Semilla no seleccionada al presentar una coloración marrón oscura, forma no redondeada y estar demasiado madura. C-F) Comparación de una semilla madura y sana con una no madura y no sana. G) Vista de un campo de semillas observadas bajo la lupa marcándose con \* las seleccionadas y con X las descartadas según los criterios de selección.

#### 2.1.3.3. Posición o altura de sembrado en los *cassettes*

Los diferentes genotipos utilizados en *Seedling Growth* poseen una longitud media de crecimiento a los 6 días diferente. Es totalmente imprescindible que las plántulas dispongan en el interior del cassette de un espacio suficiente para el crecimiento sin alcanzar la cubierta, ya que se producirían interferencias por tigmotropismo en los resultados obtenidos, sobre todo en el estudio del fototropismo. Por ello, en función de esta longitud, las semillas de cada genotipo se siembran a la altura adecuada calculada desde el extremo inferior del cassette para evitar el contacto (TABLA 1).

Además, debido a que la videocámara del EMCS es fija, el ángulo con el que se capturan las imágenes de los cassettes de las posiciones 1 y 5 del EC dificulta la visión de una parte del cassette. Por este motivo, las semillas sembradas en estos cassettes se desplazan 1,5mm hacia arriba en el cassette 1 y 1,5mm hacia abajo en el cassette 5, respecto de su posición inicial.

Estos dos aspectos, marcan la altura de sembrado de las semillas de cada genotipo, y por tanto, la configuración del EC *map*.



Genotipo	Posición (mm)
WT (Ler)	10,5
<i>phyA</i>	9
<i>phyB</i>	9
WT (Col-0)	9
<i>aux1.7</i>	10
<i>eir1.1</i>	10
<i>tir1</i>	10
<i>nuc1</i>	9
<i>nuc2</i>	9

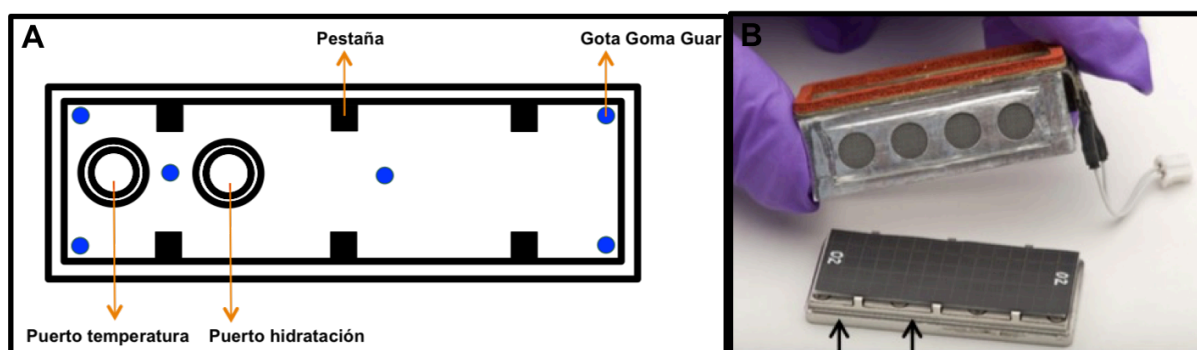
**Tabla 1. Altura de sembrado de cada genotipo utilizado en el experimento *Seedling Growth* (cassettes 2 a 4).** Posición en milímetros desde el extremo inferior del *cassette* a la que se siembra cada línea de *Arabidopsis thaliana*. Pequeñas adaptaciones derivadas de la captura de imágenes en los cassettes 1 (+1,5 mm) y 5 (-1,5 mm) son requeridas.

#### 2.1.4. Ensamblaje de los cassettes

El ensamblaje de los cassettes comienza colocando las bases en una superficie de trabajo limpia y con ayuda de unas pinzas limpias son colocadas, en cada puerto, una junta de silicona (Fisher Scientific#SX0001301) y dos filtros de 22µm (*Millipore Filter*, Fisher Scientific#GSWP01300). Estos dos componentes se inmovilizan con la lámina de sujeción fijada a la base con ocho tornillos, los cuales se sellan con una gota de Goma Guar (1% p/v). A continuación, se coloca el papel de filtro Whatman embebido en medio de cultivo y seco por las pestañas de la cubierta, pre-prensado en doble bisel (*Famco WSR81 Press*) para facilitar su colocación. En este punto las bases ya están ensambladas y se esterilizaron a 121°C durante 20 min.

Una vez esterilizadas las bases, se puso una gota de Goma Guar (1% p/v) estéril en cada una de las cuatro esquinas del papel Whatman, una entre los dos puertos y otra a la derecha del puerto de hidratación. Rápidamente y sin que se sequen las gotas, con unas pinzas flameadas, la membrana de nitrocelulosa con la semillas se coloca y se deja secar en la campana de flujo laminar al menos 20 minutos. La membrana debe colocarse de manera que los puertos de la base queden a la izquierda y las semillas sembradas en la parte superior del cassette (FIGURA 30).

Por último, se colocaron las cubiertas, quedando los cables del sistema anti-condensación, a la derecha y los puertos a la izquierda; la zona de contacto entre la base y la cubierta fue sellada con una cinta de aluminio (*Aluminum Foil Tape ¼ inch, 3M™#S-18568*) asegurándose de que quedaba bien pegada y conformando la forma del cassette.



**Figura 30. Montado del cassette espacial.** A) Esquema de las bases donde se señala la posición de los puertos de temperatura e hidratación, las pestañas que sujetan el papel Whatman con el medio de cultivo y las gotas de Goma Guar para adherir la membrana de nitrocelulosa con las semillas. B) Imagen del cierre del cassette mostrando la posición adecuada de la cubierta, quedando los puertos a la izquierda (flechas), los cables a la derecha y las semillas en la parte superior del cassette.

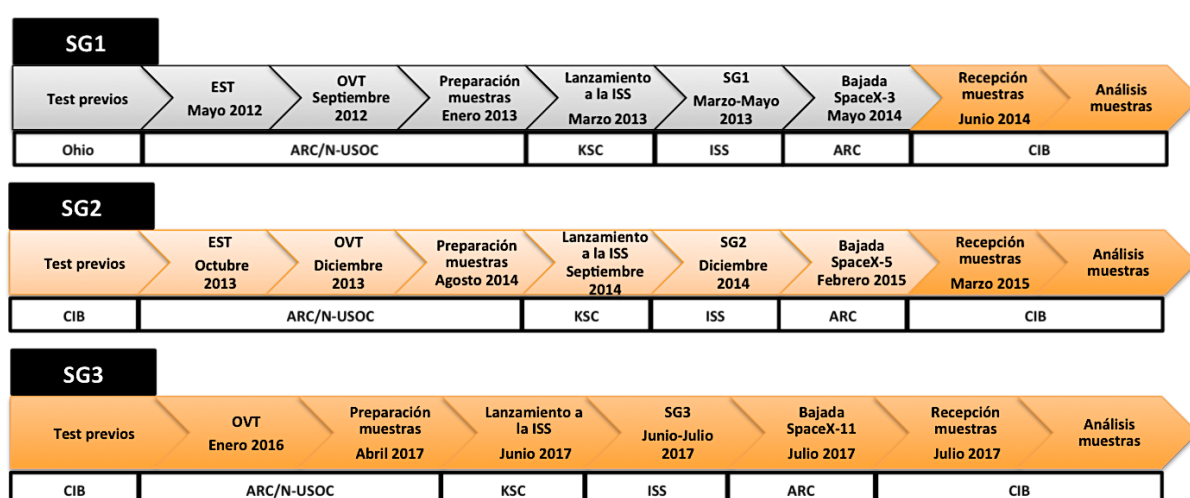
## 2.2. Optimización de los materiales, técnicas y requerimientos en el experimento espacial “Seedling Growth” (*Tests de laboratorio*)

Un experimento espacial ofrece un ambiente único para la investigación en biología, pero la realización de un experimento en la ISS requiere años de planificación y de “tests” o pruebas previas a su ejecución. Algunas de las complejas etapas que preceden a un experimento espacial son: desarrollo de un protocolo y calendario experimental, pruebas de biocompatibilidad del *hardware*, coordinar la logística y lanzar las muestras a la ISS (Kiss et al. 2007b, 2009). Por ello, todas las fases del experimento “Seedling Growth” incluyeron dos *tests* previos a su lanzamiento y ejecución en la ISS: el “*Schedule Test*” (ST) y el “*Experiment Sequence Test*” (EST) según la nomenclatura europea, denominado por la NASA “*Operations and Validations Test*” (OVT). En ambas pruebas, al igual que en el experimento espacial, el montaje de los cassettes y su ensamblaje en el EC tuvo lugar en ARC, pero su desarrollo (hidratación y crecimiento de las plántulas) ocurrió en el “*EMCS Engineering Model*” (réplica) presente en el N-USOC.

El primer *test* o ST tiene como propósito crear un protocolo para ser implementado en el experimento espacial y para ello se comprueban todos los aspectos técnicos del EMCS, como son la calibración de la cámara, el funcionamiento de las luces, los niveles de gravedad en las centrifugas, las condiciones atmosféricas y la hidratación de los cassettes.

El segundo *test* (EST/OVT) es un ensayo general del experimento espacial, en el que se recrean todos los pasos del experimento, incluidos los que tiene que realizar la tripulación al comienzo y finalización de la etapa de crecimiento e incluye el análisis de las muestras por parte del equipo del Investigador Principal. La conclusión de este *test* debe ser una serie de operaciones totalmente definidas, las cuales se deben seguir exactamente en el experimento espacial.

En la [Figura 31](#) se recopila la información temporal y el lugar en el que se desarrollaron todas estas pruebas en la serie de experimentos SG1, SG2 y SG3.



**Figura 31. Desarrollo temporal de las tres fases que constituyen “Seedling Growth”.** En gris se muestran las etapas llevadas a cabo por el equipo americano. En naranja se muestran las etapas realizadas por nuestro grupo, marcándose en naranja oscuro las realizadas personalmente durante el desarrollo de esta tesis.

## 2.2.1. Tests de Germinación

Conseguir un porcentaje alto de germinación con crecimiento homogéneo, que asegure el éxito del experimento, es responsabilidad del equipo del Investigador Principal y por ello se realizó una propagación de semillas continua durante los años en los que estuvo activo el experimento espacial, como una serie de *tests* de germinación rutinarios.

### 2.2.1.1. Propagación y chequeo de los distintos lotes de semillas

La propagación de las semillas se realiza de forma rutinaria de modo que se obtienen tres lotes de semillas por año aproximadamente. El proceso comienza con la siembra de semillas de cada genotipo en tiestos con tierra suplementada con vermiculita y se dejan

crecer a 22°C con fotoperiodo (16h luz blanca/8h oscuridad) en la cámara de cultivo aproximadamente 2-3 meses. Cuando se forman las silicuas (vaina con semillas dentro) se tapa la parte aérea de la planta con un sobre de papel para impedir la caída y pérdida de las semillas. La planta se sigue regando dos veces por semana hasta su secado total, momento en el cual se corta la parte aérea y se almacenan los sobres con las semillas durante un mes más en oscuridad. Por último, se recuperan las semillas con ayuda de un colador metálico.

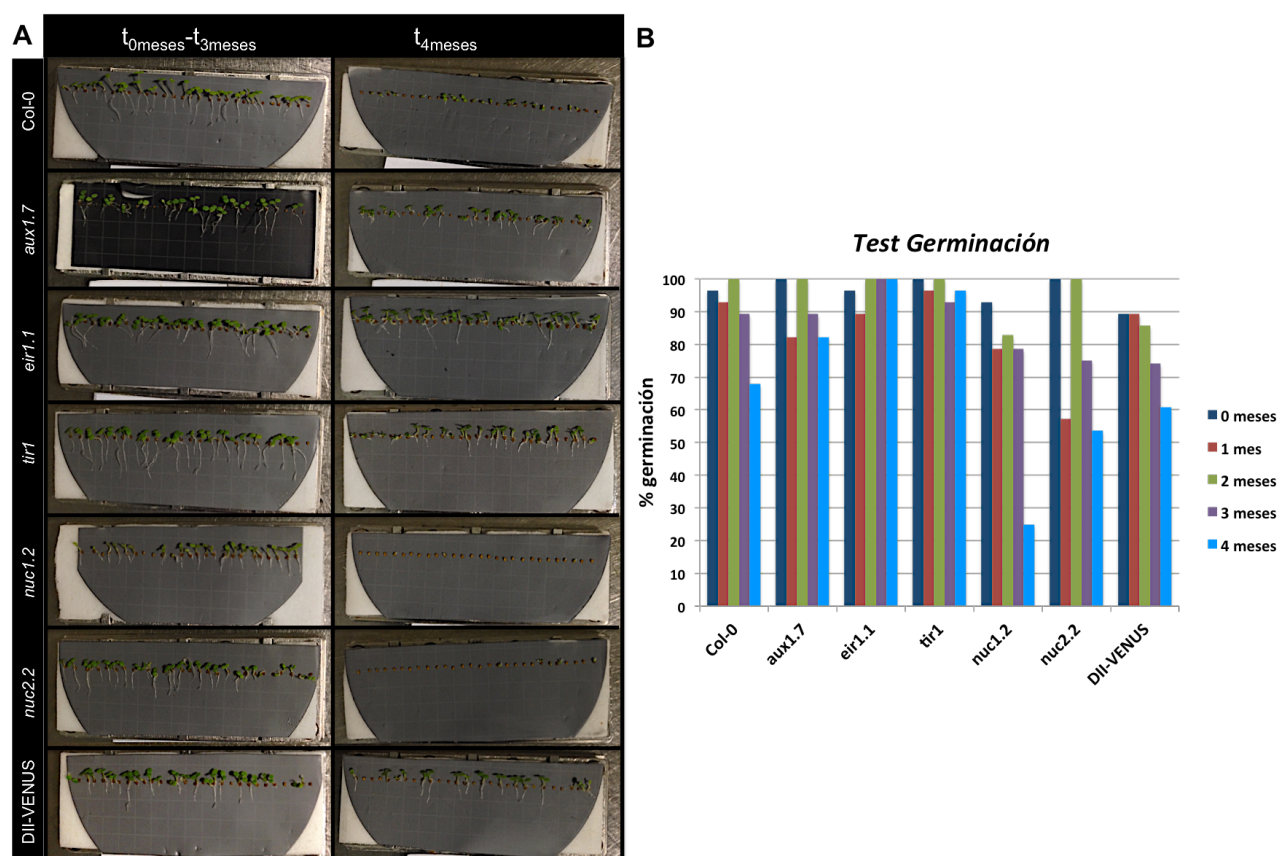
La comprobación de la calidad de las semillas se realiza tras cada recogida y para ello se siembran las semillas, y las plántulas crecen, de la misma manera que en los cassettes espaciales (en papel impregnado en medio de cultivo y semillas seleccionadas en membrana de nitrocelulosa), pero en Placa Petri para poder comparar los distintos lotes. Esto se lleva a cabo para detectar lotes con bajo porcentaje de germinación o mal crecimiento y sólo utilizar aquellos con mejor tasa de germinación y buen crecimiento.

#### 2.2.1.2. Test de Germinación SG3

El tiempo que lleven sembradas las semillas con Goma Guar en la membrana de nitrocelulosa es un importante factor a la hora de conseguir una alta tasa de germinación ( $\geq 80\%$ ) (Kiss et al. 2009, 2007b).

Para determinar cuánto tiempo pueden estar sembradas las semillas sin afectar a su germinación se realizó un experimento que consistió en sembrar, simultáneamente, cinco membranas por genotipo. Esas membranas se almacenaron secas a temperatura ambiente y oscuridad hasta que fueron montadas en cassettes e hidratadas inmediatamente, 1 mes, 2 meses, 3 meses y 4 meses tras la siembra. Transcurridos 4 días tras la hidratación se calculó el porcentaje de germinación, considerándose semilla germinada aquella que se muestre hidratada y con una incipiente raíz.

Al finalizar el *test* se observó que la tasa de germinación se mantenía en niveles altos, de al menos el 80%, durante los 3 meses después de su siembra, pero este porcentaje disminuía significativamente (70%-40%) al cuarto mes en la mayoría de los genotipos, y especialmente en los mutantes de nucleolina (FIGURA 32). De esta forma se estableció que las semillas no debían almacenarse más de 3 meses desde la siembra hasta su hidratación.



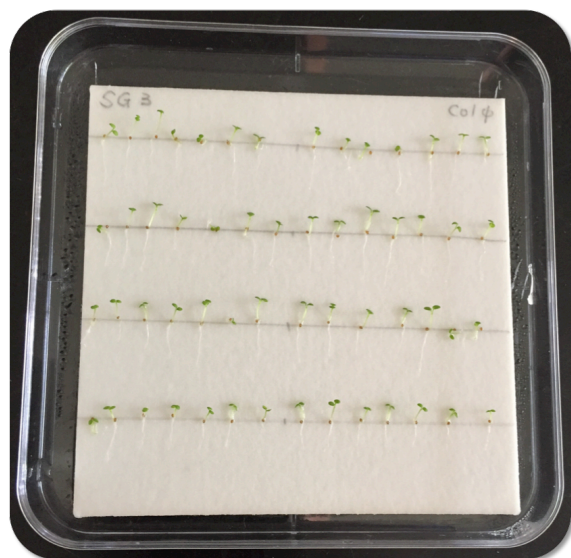
**Figura 32. Test de Germinación SG3.** A) Imagen ejemplo de cada genotipo cuando hidratamos a los 0-3 (izquierda) y a los 4 meses (derecha) tras la siembra. B) Gráfica mostrando el porcentaje de germinación de cada genotipo a los 4 días después de la hidratación dependiendo de la duración del periodo de almacenamiento siembra-hidratación.

### 2.2.1.3. Ground Germination Test

El experimento espacial, así como el EST/OVT, están acompañados de tres fases de chequeo de germinación de las semillas o “Ground Germination Test”. Al mismo tiempo que se seleccionan y siembran las semillas para los experimentos se siembran tres papeles Whatman (previamente impregnados en medio de cultivo) con aproximadamente 50 semillas cada uno y se almacenan en Placa Petri secos a temperatura ambiente hasta su hidratación.

El primero se hidrata durante la fase de construcción de los cassettes para comprobar la germinación de los distintos lotes y en caso de obtener una tasa de germinación baja poder repetir el proceso de selección y sembrado de las semillas en nuevas membranas de nitrocelulosa. El segundo se hidrata una semana antes del lanzamiento del experimento a la ISS para comprobar que su almacenamiento hasta ese día no ha influido en la germinación de las semillas. El tercero se hidrata durante el desarrollo del

experimento espacial para comprobar que su ensamblaje en el *hardware* y su traslado no causan una reducción en la germinación (FIGURA 33).



**Figura 33. Ground Germination Test.** Imagen correspondiente al chequeo de la tasa de germinación del genotipo Col-0. En este caso, durante la etapa de crecimiento de las plántulas, en el experimento SG3.

### 2.2.2. Tests de fijación

Uno de los requerimientos del experimento “Seedling Growth 3” fue la fijación química de las muestras biológicas en la ISS sin tener que desmontar el cassette. Esto planteó varios problemas y necesidades, tales como:

- El diseño y fabricación de un dispositivo o *hardware*, que se denominó *FixBox*, capaz de inyectar la solución fijadora en el interior de la cámara de cultivo de forma automática. Esta tarea fue llevada a cabo por la empresa española NTE-SENER (Barcelona) por concesión de la ESA.
- La adaptación de los cassettes (cámaras de cultivo) para albergar un líquido, ya que su diseño no está preparado para ello.
- La necesidad de simular en tierra el comportamiento de la solución fijadora, teniendo en cuenta la dinámica de fluidos en un ambiente de microgravedad real.
- La determinación del tiempo máximo de exposición de las muestras biológicas a la solución fijadora antes de la aparición de artefactos y daños estructurales a nivel celular y subcelular, con el objetivo de establecer los plazos admisibles para el retorno a la Tierra de las muestras, tras la realización del experimento espacial, en las mejores condiciones para el análisis post-vuelo.

Realizamos varias pruebas para determinar el protocolo a seguir en esta fase del experimento espacial.



### 2.2.2.1. Test de Fijación en placa

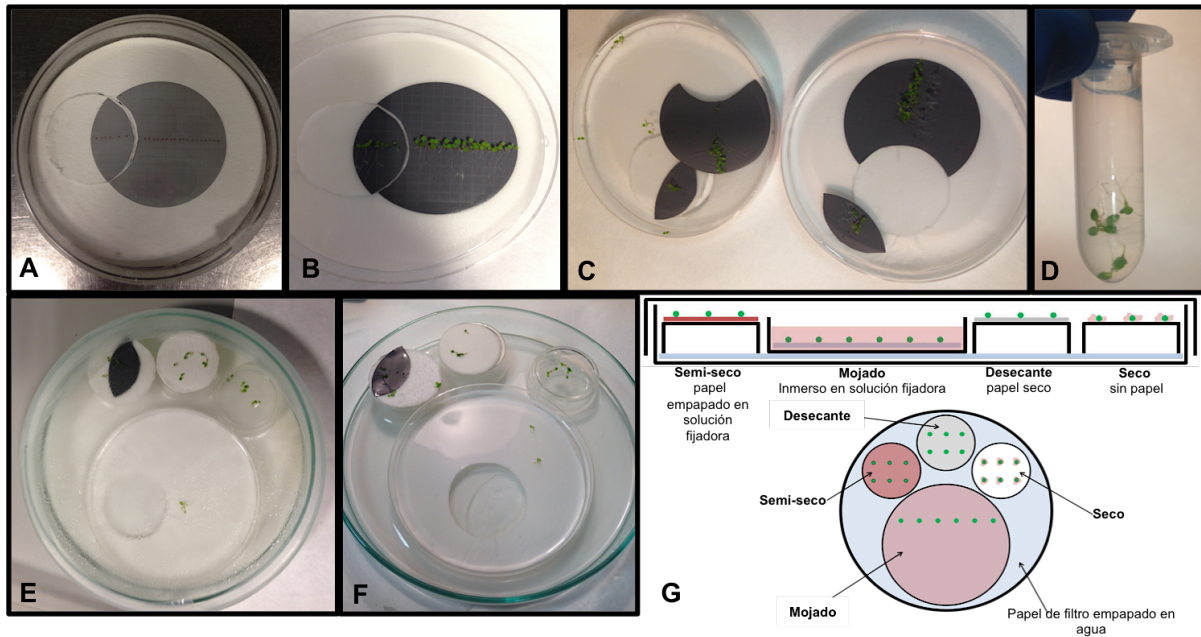
Este *test* se realizó para simular varias situaciones que pueden sufrir las plántulas dentro de los cassettes cuando son llenados con un líquido. Nos preocupaba que, en condiciones de microgravedad real, pudieran aparecer burbujas en el fijador que pudieran atrapar total o parcialmente a una o varias plántulas, quedando muestras o partes de muestras no inmersas en la solución y produciéndose la pérdida de este material por degradación. Además, también se estudió el efecto añadido de almacenar las muestras en la solución fijadora durante 3 semanas o 2 meses.

Esta prueba consistió en preparar 3 placas Petri (9cm de diámetro), cada una, con 24 semillas de *Arabidopsis thaliana* genotipo silvestre (Col-0), de igual forma que se construyen los cassettes espaciales (papel Whatman impregnado en medio de cultivo, selección y siembra de semillas con Goma Guar en membrana de nitrocelulosa) (FIGURA 34). Las semillas fueron germinadas y las plántulas crecieron durante 6 días a 23°C con fotoperiodo (16h horas luz blanca/8h oscuridad), tras ser hidratado el papel con una cantidad de agua equivalente (7ml) a la que se inyectará en el cassette espacial. Finalizado el periodo de crecimiento se añadió fijador a dos de las placas, en cantidad suficiente para cubrir las plántulas (aproximadamente 40ml/placa) y se mantuvo durante 3 horas a temperatura ambiente (protocolo estándar). Transcurrido este tiempo, en un ambiente de humedad saturada, se colocaron 6 plántulas sobre tres bloques de plástico de la siguiente manera: con papel de filtro impregnado de solución fijadora (semi-seco), con un papel de filtro seco (condición de desecación) y directamente sobre el bloque de plástico (seco). Las restantes 6 plántulas permanecieron inmersas en la solución fijadora (mojado) (FIGURA 34).

En esta configuración, las muestras se almacenaron selladas con Parafilm a 4°C, bien durante 3 semanas, o bien durante 2 meses.

Las plántulas restantes en cada placa se fijaron durante 3 horas a temperatura ambiente en tubo (condiciones estándar del laboratorio) y fueron procesadas inmediatamente (deshidratación e inclusión en resina) sirviendo como control a tiempo cero para poder comparar la calidad de la fijación tras el almacenamiento (ver apartado 4.2 de Material y Métodos).

En este caso, solo se ensayó una de las dos soluciones fijadoras que forman parte de SG3: glutaraldehído 4,5% (GA)+ paraformaldehído 1,5% (PFA) en PBS.



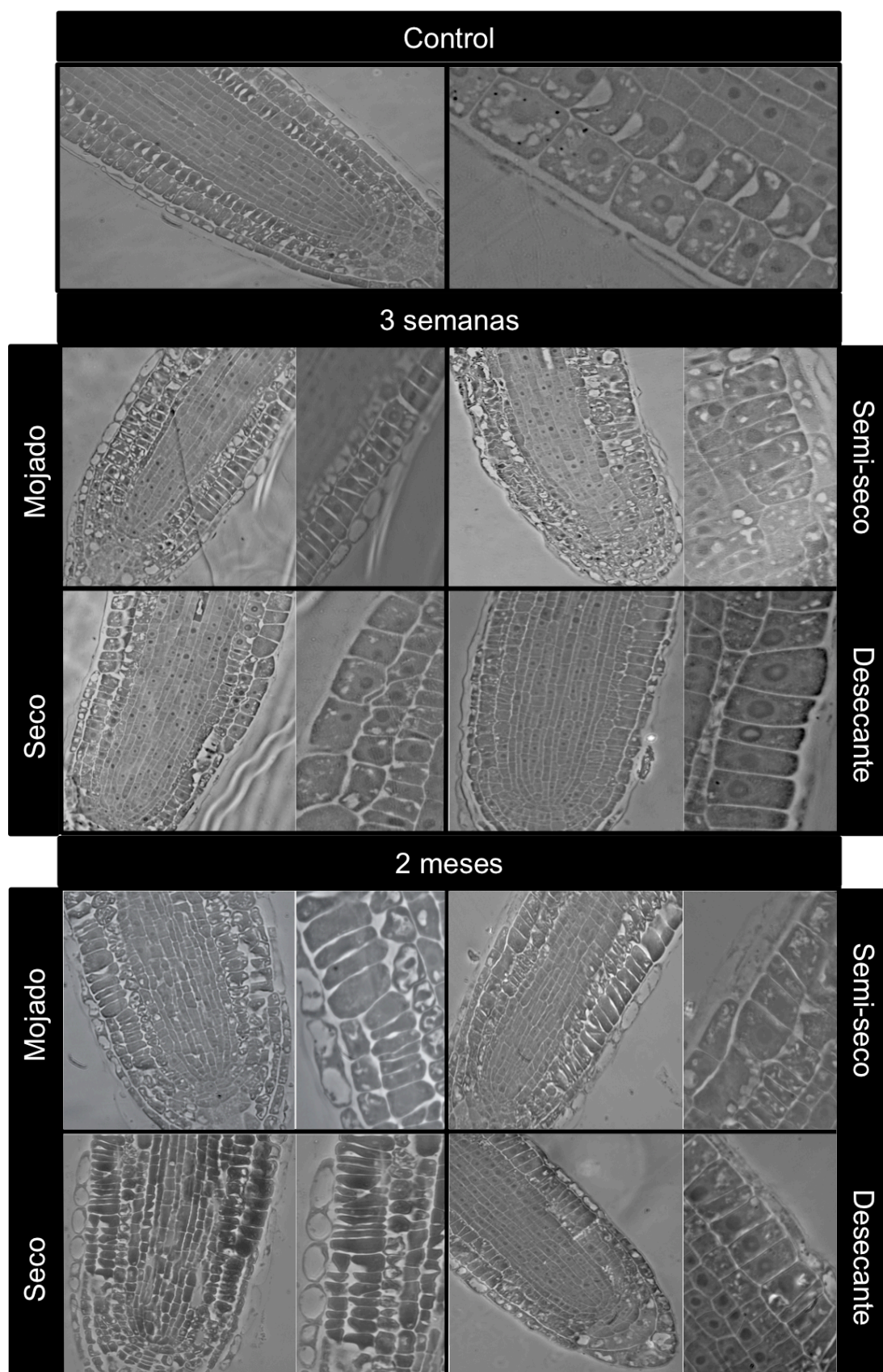
**Figura 34. Protocolo seguido en el Test de Fijación en placa.** A) Montado de las placas siguiendo el mismo procedimiento que con los cassettes espaciales. B) Crecimiento de las plántulas transcurridos 6 días desde la hidratación de la placa. C) Fijación de las placas con la solución fijadora (glutaraldehído 4,5%+paraformaldehído 1,5% en PBS) y D) control fijado en condiciones estándar del laboratorio (tubo). E) División de las plantas en las diferentes situaciones ensayadas y sellada para su almacenamiento a 4°C. F) Placa tras su almacenamiento durante 3 semanas o 2 meses. G) Esquema de colocación de las plantas en las diferentes situaciones posibles dentro del cassette.

Después del periodo de almacenamiento (3 semanas o 2 meses), las muestras fueron procesadas (deshidratación e inclusión en resina) para comprobar la calidad de la fijación en los parámetros estructurales del meristemo radicular usando cortes semifinos observados al microscopio en contraste de fases (FIGURA 35).

Las muestras utilizadas como control mostraron una calidad de fijación buena, con el citoplasma de las células sin contraer y poco vacuolado, y con un núcleo grande y redondo, en el que se puede distinguir el nucléolo (denso y redondo) y la cromatina (densidad media).

Las muestras almacenadas durante 3 semanas, en general, presentaron una fijación más irregular con partes de la raíz más dañadas, concretamente con células con citoplasma contraído y mayor vacuolación. Las plántulas que se mantuvieron inmersas en la solución fijadora presentaron una calidad de fijación incluso peor que las que estuvieron en los bloques de plástico, lo cual puede ser debido a que durante todo este tiempo se mantuvieron flotando por la tensión superficial del líquido no pudiendo penetrar bien la solución fijadora en ellas. A pesar de que las condiciones no eran las óptimas, en todas la muestras se encontró un grupo de células con una aceptable preservación estructural.





**Figura 35. Imágenes del meristemo radicular de las plantas pertenecientes al Test de Fijación en placa.** Se muestra un ejemplo de cada condición (mojado, seco, semi-seco y desecante) a los dos tiempos de almacenamiento a 4°C (3 semanas y 2 meses) además de la correspondiente condición control (fijación en tubo y sin almacenamiento). En todas las condiciones se muestra una imagen correspondiente a una visión global de la punta de la raíz (izquierda) y un detalle de las capas de células que conforman el meristemo radicular (derecha).

En cambio, tras 2 meses de almacenamiento, la calidad de la fijación fue mucho peor en todas las condiciones. En la mayoría de las células de estas raíces no se conservó la estructura subcelular, no distinguiéndose, orgánulos como el núcleo. Por lo tanto, la calidad de la fijación se estimó insuficiente para alcanzar los objetivos del experimento espacial.

#### 2.2.2.2. Test de Fijación en cassette

Una vez disponibles en el laboratorio los componentes del *cassette* (bases y cubiertas) se llevó a cabo otro test de fijación para evaluar la calidad de la fijación, pero esta vez, ya en el *hardware* espacial.

El test comenzó con el ensamblaje de tres *cassettes* siguiendo el protocolo de la NASA, pero introduciendo algunas modificaciones para adaptarlos al llenado con la solución fijadora:

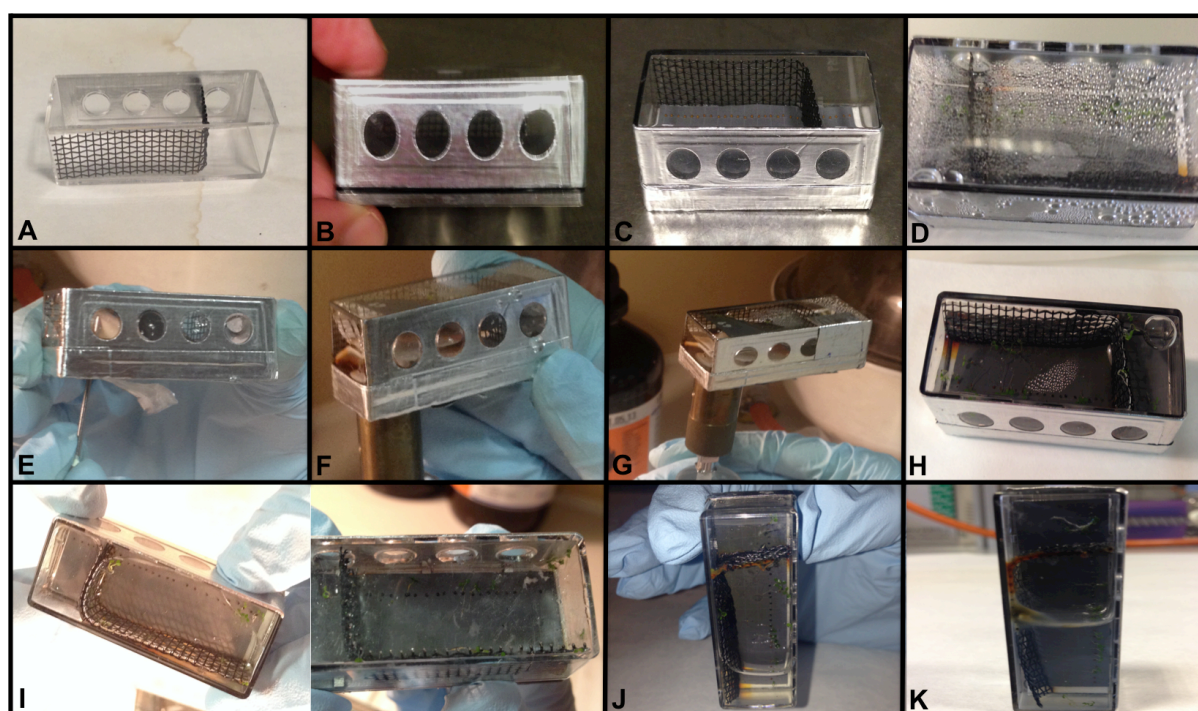
- Introducción de un anillo o junta de silicona (*O-ring*) entre la base y la cubierta para evitar fugas del líquido que albergue el *cassette*.
- Utilización de un separador metálico para dividir el *cassette* dejando algunas plantas fuera de la solución fijadora durante el periodo de almacenamiento.
- Realización de un agujero (1mm) en una ventana de la cubierta que permitió aumentar el volumen de llenado del *cassette*, de un 20%-40% hasta un 50%-60% de su capacidad, por la disminución de presión en su interior al salir aire a medida que entra el líquido.

Los *cassettes* fueron montados con los nuevos componentes y 28 semillas de *Arabidopsis thaliana* genotipo silvestre (Col-0) (FIGURA 36). Tras la hidratación de éstas (0,9ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>), las plántulas crecieron durante 6 días a 23°C con fotoperiodo (16h horas luz blanca/8h oscuridad). Una vez crecidas las plántulas, se realizó un agujero de 1mm de diámetro en la parte superior de la cuarta membrana desde el puerto de temperatura en posición horizontal y se inyectó manualmente la solución fijadora (glutaraldehído 4,5%+paraformaldehído 1,5% en PBS) por este puerto hasta que salió una gota por el agujero de la membrana (volumen máximo de llenado= 5,5ml, aproximadamente el 60% de la capacidad del *cassette*).

## Material y Métodos

Antes de retirar el inyector del puerto se tapó el agujero de la membrana con cinta metálica para evitar fugas de la solución fijadora. Por último, se selló el puerto de temperatura y se destapó la cuarta ventana.

En este momento, las muestras fueron fijadas durante 3 horas a temperatura ambiente en posición horizontal. Después de este tiempo, uno de los *cassettes* se abrió y se continuó con el protocolo (control) (ver apartado 4.2 de Material y Métodos), y los otros dos se almacenaron en posición vertical a 4°C durante 3 semanas y 2 meses.



El análisis de las muestras, como en el *test* anterior, se basó en criterios relacionados con la conservación de la estructura (citoplasma y núcleo) de las células que componen la punta de la raíz y más en concreto, de las células meristemáticas (FIGURA 37).

La fijación de la muestra control fue de buena calidad, al conservarse la estructura de la raíz, manteniéndose todas las filas de células que la conforman. Las células mostraron un citoplasma compacto, algunas veces con vacuolas, y un núcleo muy bien conservado, pudiéndose distinguir sus componentes (nucléolo y cromatina).

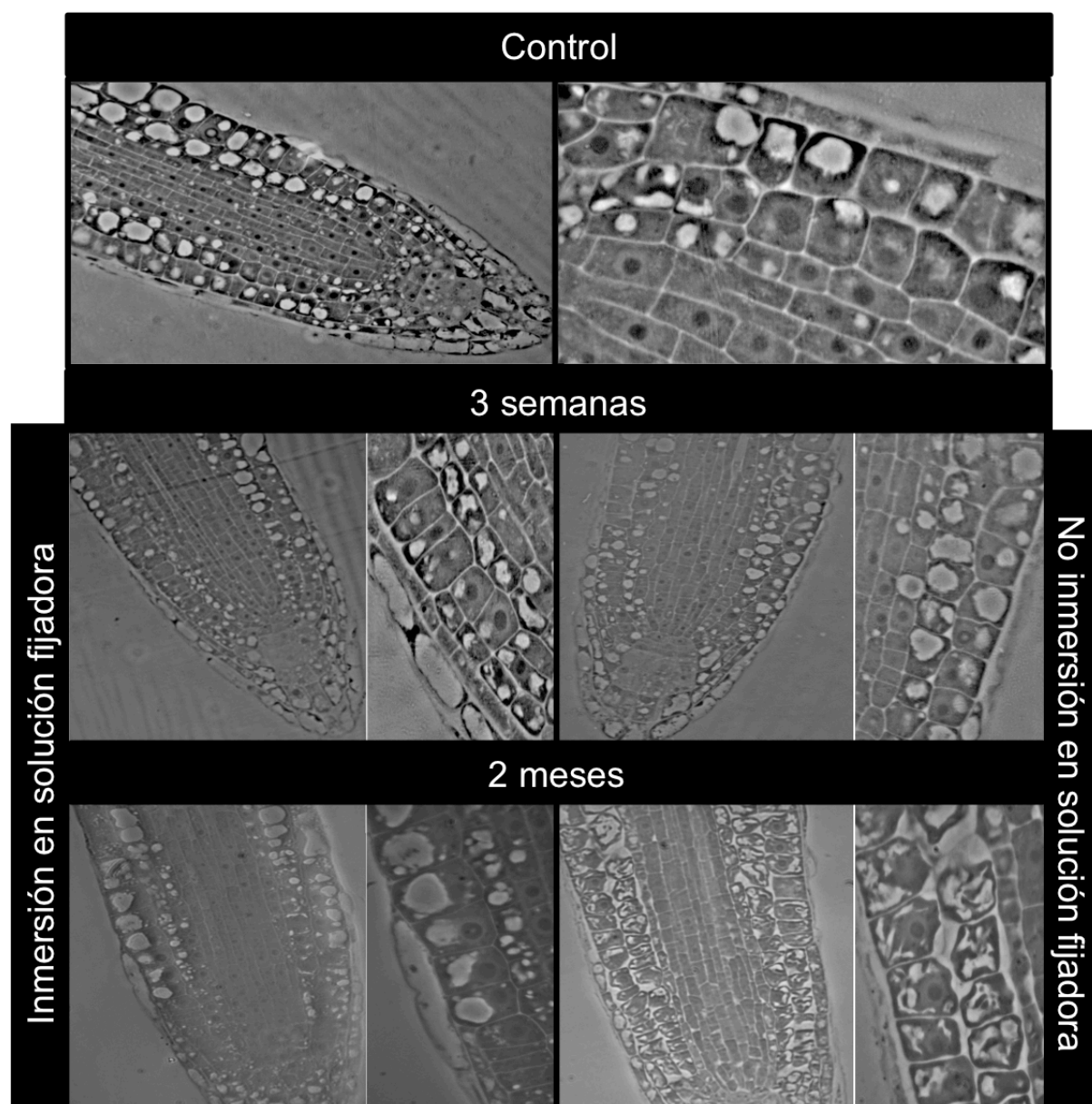
Las muestras almacenadas durante 3 semanas e inmersas en solución fijadora presentaron una calidad de fijación muy similar a la del control. En cambio, en las muestras no sumergidas en esta solución se observó una peor fijación, con un mayor número de vacuolas que eran de mayor tamaño en el citoplasma, pero con algunas células en buen estado en cuanto a sus componentes subcelulares u orgánulos.

El almacenamiento durante 2 meses produjo graves daños en la estructura de la raíz tanto en las muestras inmersas en solución fijadora como en las no inmersas, mostrando las células una fuerte contracción de su citoplasma (filas de células no conexas, con huecos) así como en sus componentes subcelulares (núcleos deformados).

Las conclusiones a las que se llegó tras la realización de estos dos *Tests* de Fijación (*Test* Fijación en placa y *Test* Fijación en *cassette*) impusieron nuevas limitaciones al experimento espacial, que debía ser realizado siguiendo estas indicaciones:

- Las muestras biológicas no deben almacenarse más de 3 semanas en solución fijadora, por lo que el experimento se realizó durante la fase de acoplamiento (*"docking phase"*) de la cápsula *Dragon* a la ISS. Las muestras volvieron a Tierra en el vuelo de retorno de la misma misión, aproximadamente un mes después de su lanzamiento.
- Era imprescindible el llenado del *cassette* hasta un 90%-100% de su capacidad por lo que fue necesario realizar un agujero en la cubierta del *cassette* en una posición que lo permitiera.
- Era necesario que las muestras no flotasen y se mantuvieran inmersas o sumergidas en la solución fijadora.





**Figura 37. Muestras fijadas durante el Test de Fijación en cassette.** Figura compuesta con ejemplos de plantas fijadas en *cassette* mostrándose la punta de la raíz entera (izquierda) y un detalle de las células meristemáticas (derecha). La figura recoge todas las condiciones incluidas en el *test*: control (plantas fijadas en *cassette* durante 3 horas a temperatura ambiente en posición horizontal y procesadas sin almacenamiento), y almacenamiento durante 3 semanas o 2 meses, con o sin inmersión en la solución fijadora.

#### 2.2.2.3. Test Fijación en FixBox-“Science Verification Test”

Una vez disponible el modelo científico del *FixBox* (“*Scientific Model, SM*”) por parte de la empresa responsable (NTE-SENER), se realizó un *test*, teniendo en cuenta las necesidades resultantes de las pruebas anteriores, para evaluar: el nivel de llenado de los *cassettes* con las respectivas soluciones de fijación, el movimiento de las plantas

dentro del *cassette* después de la inyección de las soluciones fijadoras y la calidad de la fijación después del periodo de almacenamiento de 3 semanas.

Las soluciones fijadoras utilizadas en este *test* fueron cuatro:

- glutaraldehído 4,5%+paraformaldehído 1,5% en PBS
- glutaraldehído 4,5%+paraformaldehído 1,5%+ferrofluido 30% en PBS
- paraformaldehído 5% en PBS
- paraformaldehído 5%+ferrofluido 30% en PBS

La incorporación de ferrofluido fue una propuesta de NTE-SENER para prevenir la flotación de las plantas en la solución fijadora, reducir la formación de burbujas líquidas y asegurar una buena penetración de ésta en el material biológico consiguiendo una fijación de alta calidad. Además, también se produjo la incorporación de un imán de neodimio en el carrusel del *FixBox* para este fin. El ferrofluido al poseer nanopartículas de hierro, serían atraídas por el imán presionando el material biológico hacia la base del *cassette* y quedando siempre inmerso en la solución fijadora, pero era necesario comprobar su biocompatibilidad con las muestras y si existía alguna interferencia con las técnicas de análisis de las mismas, como que aparezcan daños en la ultraestructura del meristemo o se bloqueé el reconocimiento de los antígenos.

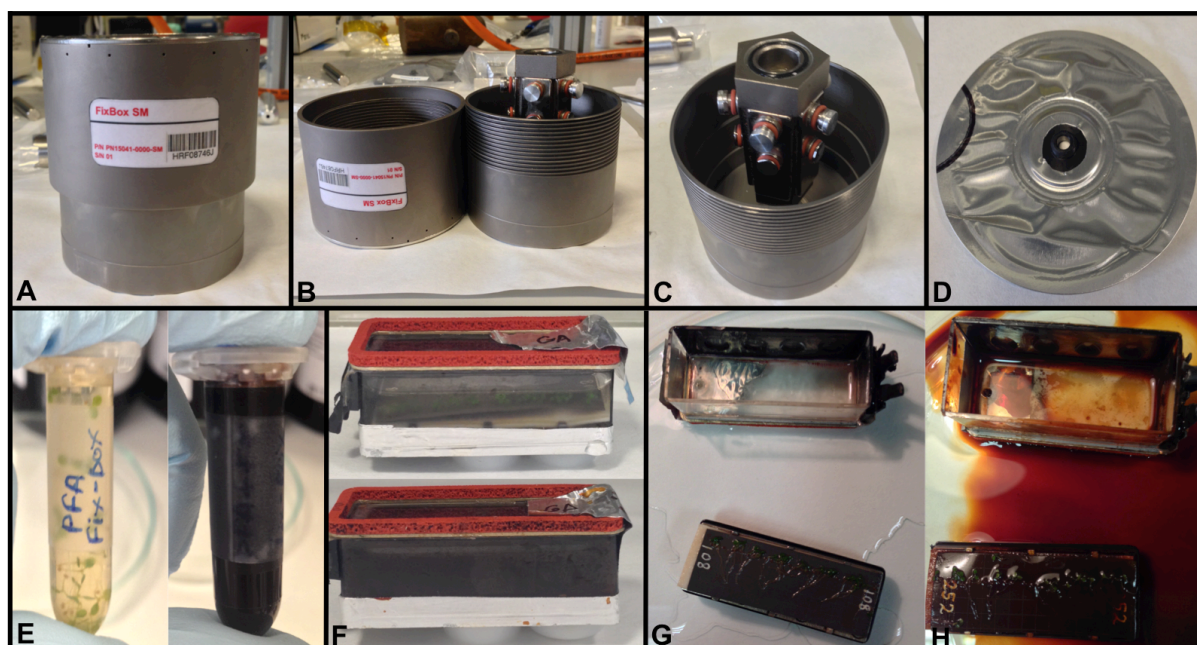
Este *test*, como el anterior, comenzó con la preparación de los *cassettes* con *O-ring* y el crecimiento de las plantas (*Arabidopsis thaliana* genotipo silvestre, Col-0) en las mismas condiciones descritas anteriormente (6 días a 23°C con fotoperiodo). Cada *cassette* se inyectó individualmente utilizando el modelo científico (SM) del *Fixbox*, (aunque permite la inyección simultánea de 5 *cassettes*, utilizamos un modelo con 4 posiciones cegadas) siguiendo los siguientes pasos (FIGURA 38):

- Corte de los cables que conectan el *cassette* al EC.
- Realización manual de un agujero en el extremo superior de la cubierta correspondiente con el puerto de temperatura (esta posición permite el llenado del *cassette* entre el 90%-100% de su capacidad).
- Llenado de la bolsa con 9ml (90%-100% del volumen del *cassette*) de la correspondiente solución fijadora y su colocación en la cubierta del *FixBox*.

- Colocación del cassette por los puertos de temperatura e hidratación en el carrusel del *FixBox* e introducción del carrusel en la cubierta del *FixBox*.
- Cerrado completo del *FixBox* para que la aguja de la base pinche la bolsa con la solución fijadora y se llene el cassette por ambos puertos.
- Apertura del *FixBox*, poniendo cinta metálica en el agujero de la cubierta y tapones en los puertos para evitar la pérdida de la solución fijadora.
- Fijación de las plantas, manteniendo el cassette en posición horizontal durante 3 horas a temperatura ambiente.
- Almacenamiento del cassette a 4°C durante 3 semanas en posición horizontal.

En paralelo, se sumergieron plantas en las mismas soluciones fijadoras pero en tubo (condiciones estándar de laboratorio), para ser utilizadas como control de la calidad de la fijación. Estas muestras también fueron fijadas durante 3 horas a temperatura ambiente y almacenadas a 4°C durante 3 semanas.

Los cuatro cassettes fueron llenados correctamente con el volumen correspondiente, aproximadamente, al 90% de su capacidad. En todos los casos, las plantas quedaron inmersas en la correspondiente solución fijadora; incluso después del periodo de almacenamiento permanecieron, unidas a la membrana de nitrocelulosa (FIGURA 38).



**Figura 38. Test Fijacion en *FixBox* (MS).** A) Modelo científico del *FixBox* ("Scientific Model", MS) B) compuesto por una base y una cubierta. C) Carrusel donde se colocan los cinco cassettes de cada EC por los puertos de temperatura e hidratación y D) bolsa que alberga los 9ml de la correspondiente solución fijadora. E) Plantas fijadas en tubo con y sin ferrofluido (control). F) Cassettes llenos utilizando el *FixBox*. G) y H) Cassettes abiertos mostrando que las plantas quedan unidas a la membrana de nitrocelulosa, tanto sin ferrofluido, como sin ferrofluido tras su almacenamiento durante 3 semanas a 4°C.

Transcurridas las tres semanas de almacenamiento, los *cassettes* fueron abiertos y con las muestras fijadas en glutaraldehído se continuó con el protocolo estándar para el análisis microscópico estructural (ver apartado 4.2 de Material y Métodos), y con las muestras fijadas en paraformaldehído se continuó con el protocolo estándar de la inmunofluorescencia *in toto* (ver apartado 4.3 de Material y Métodos) utilizando como anticuerpo primario un anticuerpo anti-nucleolina1 (Anti-NUC1).

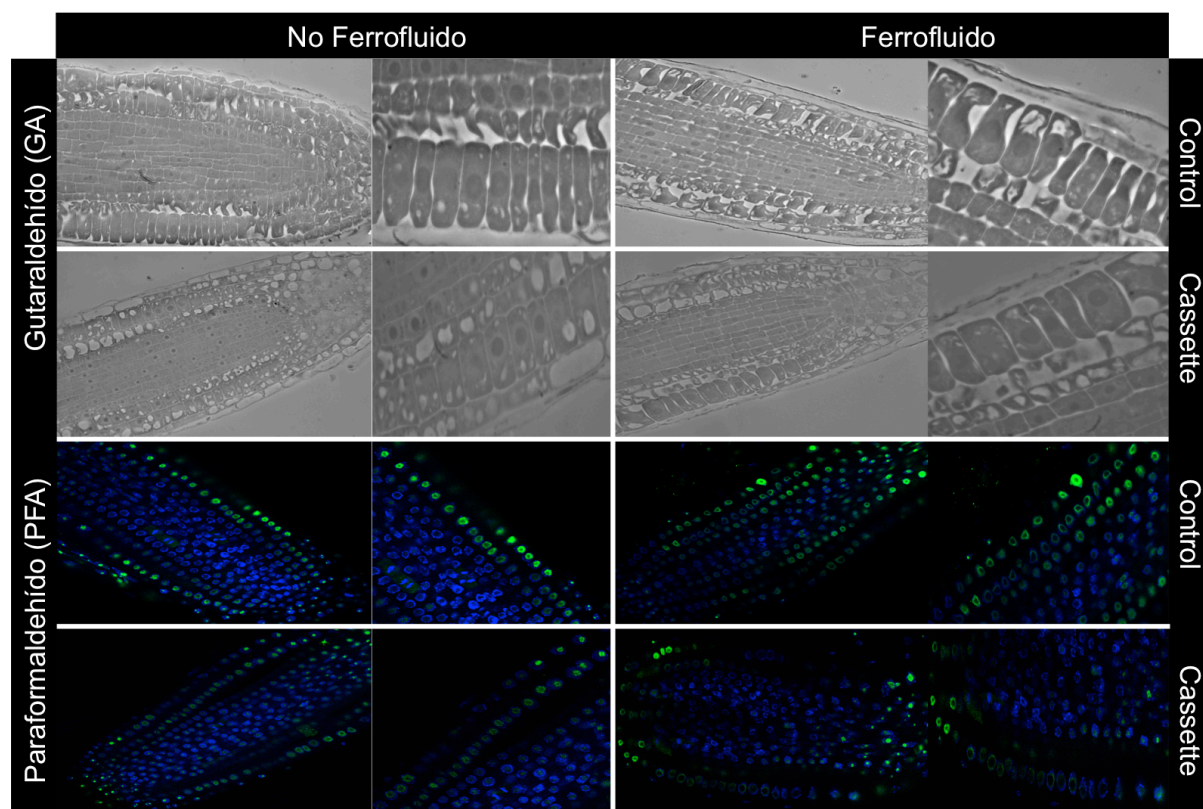
Los cortes semifinos de las muestras incluidas en resina tras su fijación y deshidratación mostraron una fijación de calidad equivalente, tanto si habían sido fijadas en cassette como en tubo en ausencia de ferrofluido (FIGURA 39). Estas muestras presentaron un citoplasma compacto sin vacuolas o de muy pequeño tamaño y núcleos grandes y redondos bien definidos. En cambio, las muestras fijadas en presencia de ferrofluido mostraron una fijación menos homogénea y, por lo tanto, peor en comparación con las anteriores. En este caso, en el citoplasma de las células se observó una fuerte contracción y vacuolas de gran tamaño, resultando una peor conservación de los componentes subcelulares.

Tras la incubación con los respectivos anticuerpos y la toma de imágenes en el microscopio láser confocal, las plantas fijadas sin ferrofluido, tanto el control como las fijadas con el *FixBox* volvieron a mostrar una fijación de calidad similar (FIGURA 39). En estas plantas se obtuvo una buena conservación del antígeno, como mostraron los núcleos (señal azul del DAPI) y nucléolos (señal verde del anticuerpo secundario fluorescente) con forma redondeada, y una buena penetración del anticuerpo primario al estar la señal de fluorescencia (verde) donde corresponde, es decir, en el interior del núcleo (azul) marcando el nucléolo. En las muestras fijadas en presencia de ferrofluido, no hubo una buena conservación de la antigenicidad debido a una peor fijación, ya que mostraron zonas sin señal, ni una buena penetración del anticuerpo primario, como mostró la señal verde (nucleolina1) en forma de halo alrededor del nucléolo.

La realización de este *test* verificó que la incorporación del ferrofluido en la solución fijadora, además de dificultar el procesamiento de las plantas por su opacidad, empeoraba la calidad de la fijación, posiblemente por reducir la permeabilidad de los fijadores y anticuerpos en el material biológico, que en última instancia, producen



daños estructurales y una peor conservación de la antigenicidad. Estos resultados junto con el hecho de que era posible llenar el *cassette* hasta un 90%-100% de su capacidad y las plantas permanecían unidas a la membrana de nitrocelulosa durante toda la duración de la prueba (y por lo tanto no es necesario el efecto tractor del ferrofluido hacia el imán), se decidió no añadir ferrofluido a las soluciones fijadoras en la misión espacial.



**Figura 39. Comparación de la calidad de la fijación en muestras fijadas en el Test de Fijación en FixBox.** Fotografías de microscopio de contraste de fases (parte superior) mostrando la conservación estructural de la raíz (izquierda) y de la zona meristemática (derecha) y fotografías de microscopio láser confocal (parte inferior) mostrando inmunofluorescencia frente a nucleolinal1 (señal verde) y la tinción del DNA (azul), tanto de la raíz entera (izquierda) como de las filas que componen el meristemo (derecha). En la figura se muestran ejemplos de muestras fijadas en tubo (control), en *cassette* utilizando el modelo científico del *Fixbox*, tanto en presencia como en ausencia de ferrofluido.

#### 2.2.2.4. Test de Almacenamiento de Soluciones Fijadoras

En los vuelos espaciales tenemos que estar preparados para recuperar las muestras con varios días o semanas de retraso tras el experimento espacial, pero también tenemos que entregar todos los materiales con antelación, a veces de varias semanas, al lanzamiento. Estudiamos las mejores condiciones de preparación y la temperatura de

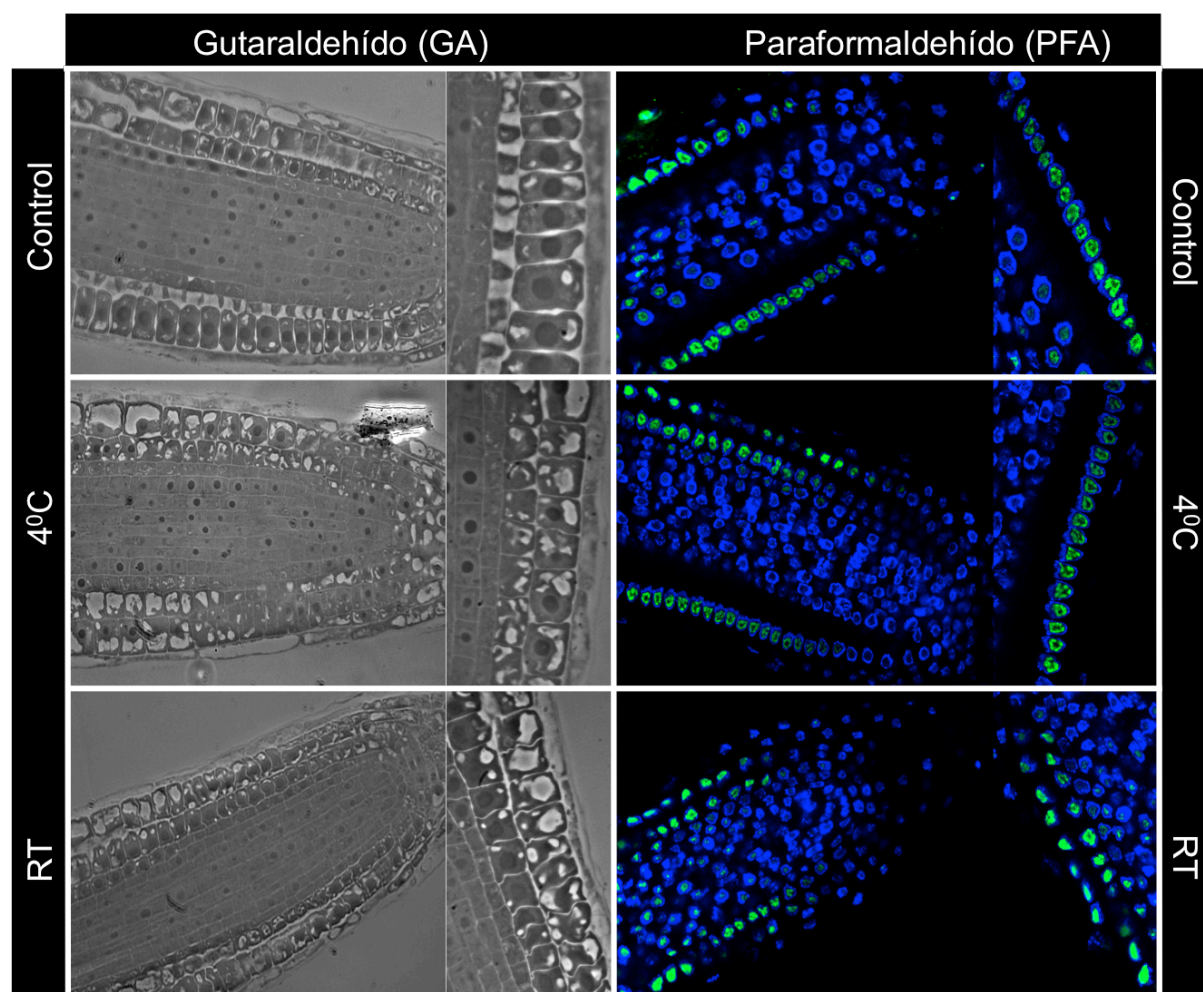
almacenamiento hasta el lanzamiento, durante éste y hasta su utilización (fijación de las muestras tras el periodo de crecimiento en el EMCS).

Esta prueba consistió en preparar las dos soluciones fijadoras (glutaraldehído 4,5%+paraformaldehído 1,5% en PBS y paraformaldehído 5% en PBS) y almacenarlas en tubos de 2ml sin nada de aire (llenos hasta rebosar) durante 3 semanas a temperatura ambiente (RT) y a 4°C. Tras este periodo de almacenamiento a las distintas temperaturas se introdujeron plántulas de *Arabidopsis thaliana* genotipo silvestre (Col-0) de 6 días, crecidas como en todos las pruebas anteriores, se fijaron durante 3h a temperatura ambiente y se procesaron para evaluar la calidad de la fijación (ver apartados 4.2 y 4.3 de Material y Métodos). Además, se realizó un control, que consistió en fijar plantas con soluciones fijadoras frescas.

Las muestras fijadas en glutaraldehído fresco (preparado antes de la inmersión de las plantas), tuvieron una fijación buena teniendo en cuenta los criterios de evaluación, es decir, las células presentaron un citoplasma poco vacuolado y unos núcleos bien conservados con forma redonda (FIGURA 40). Las muestras fijadas en la solución preparada 3 semanas antes y conservada a 4°C también tenía buena calidad de fijación, pero con un mayor número de vacuolas y de mayor tamaño. Por último, en las plantas fijadas con una solución almacenada durante 3 semanas a temperatura ambiente se observó una contracción del citoplasma, con deformación de núcleos y componentes subcelulares, indicando una fijación deficiente.

La inmunofluorescencia anti-nucleolina1 mostró en las muestras fijadas con solución fresca una excelente conservación de la antigenicidad, con núcleos redondeados, así como una muy buena penetración del anticuerpo, reflejada por unos nucléolos completamente definidos (FIGURA 40). Esta conservación de la antigenicidad disminuyó en plantas fijadas con solución almacenada a 4°C (una pequeña deformación de los núcleos y nucléolos), agravada en las muestras fijadas en solución conservada 3 semanas a temperatura ambiente, que fueron las que conservaron peor los antígenos.

La calidad de la fijación, teniendo en cuenta los resultados obtenidos, fue mejor en aquellas muestras fijadas en solución fijadora conservada a 4°C durante 3 semanas que las fijadas en solución fijadora almacenada durante el mismo periodo de tiempo a temperatura ambiente. Por lo tanto, se modificó el protocolo de entrega de los fijadores para que se preparasen lo más tarde posible en el lugar del lanzamiento de las muestras a la ISS, aproximadamente 10-8 días antes, y se impuso una temperatura de almacenamiento de 4°C desde el momento de su preparación hasta su uso en órbita (a ser posible en menos de 2 semanas desde el lanzamiento).



**Figura 40. Imágenes de plántulas fijadas durante el *Test de Almacenamiento de las Soluciones Fijadoras*.** La figura está compuesta por muestras fijadas en glutaraldehído (GA) para evaluar los parámetros de conservación estructural (parte izquierda) y por muestras fijadas en paraformaldehído (PFA) y realizada su inmunofluorescencia anti-nucleolinaL1 (señal de fluorescencia verde) para evaluar la conservación de la antigenicidad (parte derecha) a las distintas condiciones de almacenamiento de las correspondientes soluciones fijadoras: 4°C (centro) y temperatura ambiente (RT, parte inferior). También, se muestra la fijación de las muestras control, fijadas en solución fresca (parte superior).

### 2.2.3. “Operations and Validations Test” (OVT) de *Seedling Growth 3*

Este test fue el ensayo general del experimento espacial, y se realizó teniendo en cuenta todos los resultados y conclusiones obtenidos de las pruebas o *test* previos a su ejecución, para la determinación de la secuencia de acciones que se seguirían en el experimento espacial SG3.

Este *test* comenzó en ARC (California) con el montado de los cassettes y su ensamblaje en los correspondientes ECs aproximadamente un mes antes de la hidratación de éstos. En concreto, se utilizaron para este *test* cuatro ECs con cassettes con todos los genotipos utilizados en SG3 (EC map, TABLA 2), de los cuales solo tres fueron utilizados para la fijación de las muestras con el *FixBox*, mientras que el otro fue tratado como si las muestras fueran congeladas a -80°C, intentando reproducir todas las actividades que se efectuaran en órbita con 16 ECs.

OVT-Seedling Growth 3				
EC	Genotipo	nº semillas /cassette	Fotoestimulación	Tratamiento
EC1	<i>eir1.1</i>	22	Oscuridad	Fijación (paraformaldehído 5% en PBS)
	<i>tir1</i>	22		
	<i>aux1.7</i>	22		
	<i>nuc1</i>	22		
	<i>nuc2</i>	22		
EC2	<i>eir1.1</i>	22	Luz Roja	Fijación (glutaraldehído 4,5%+paraformaldehído 1,5% en PBS)
	<i>tir1</i>	22		
	<i>aux1.7</i>	22		
	<i>nuc1</i>	22		
	<i>nuc2</i>	22		
EC3	Col-0	22	Oscuridad	Ninguno
	<i>nuc1</i>	22		
	DII-VENUS	22		
	<i>nuc2</i>	22		
	Col-0	22		
EC4	Col-0	22	Luz Roja	Fijación (paraformaldehído 5% en PBS)
	<i>nuc1</i>	22		
	DII-VENUS	22		
	<i>nuc2</i>	22		
	Col-0	22		

**Tabla 2. Configuración de los cassettes en los diferentes ECs que compusieron el OVT de *Seedling Growth 3*.** EC map que especifica que genotipo es sembrado en cada *cassette* y que posición ocupan dichos cassettes en el EC. Además del número de semillas sembradas, la fotoestimulación a la que son sometidas las plantas durante los dos últimos de la etapa de crecimiento y el tratamiento que sufren después de esos 6 días.

Los ECs destinados a ser fijados en el *FixBox* fueron marcados con unas etiquetas para facilitar a la tripulación el protocolo a seguir con cada EC. Las etiquetas utilizadas fueron: un cuadrado azul para las muestras fijadas con paraformaldehído 5% en PBS y

un círculo verde para las muestras fijadas con glutaraldehído 4,5%+paraformaldehído 1,5% en PBS. Los ECs, cuyo tratamiento era la congelación no poseían ninguna etiqueta (FIGURA 41).

La preparación de los *FixBox*, concretamente el llenado de las bolsas con las correspondientes soluciones fijadoras y volumen suficiente para 5 cassettes (50ml/bolsa), comenzó en las instalaciones de la empresa NTE-SENER en Barcelona aproximadamente dos semanas antes de la hidratación de los cassettes. Los *FixBox*, al igual que los ECs, fueron marcados con las etiquetas estipuladas (FIGURA 41).

Una vez preparados los ECs y los *FixBox* con sus respectivas etiquetas fueron enviados al N-USOC. Los ECs fueron transportados a temperatura ambiente y los *FixBox* a 4°C.

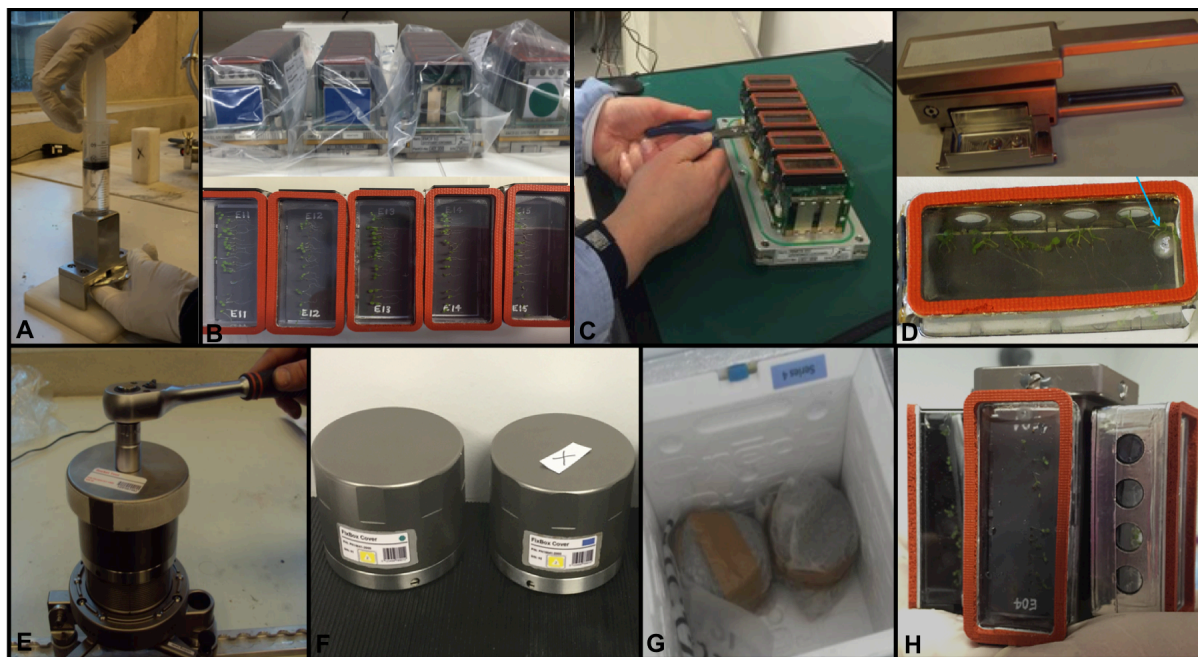
En el N-USOC (Trondheim, Noruega), los ECs fueron instalados en el EMCS, tuvo lugar la hidratación de los cassettes y se inició el crecimiento de las plántulas siguiendo todas las fases definidas en las mismas condiciones experimentales (luz, temperatura y atmósfera) de SG3 (descritas en Figura 40). Transcurrido el periodo de crecimiento, se procedió a la fijación de los ECs etiquetados para ello, almacenados hasta el momento a 4°C, siguiendo los siguientes pasos (FIGURA 41):

- Extracción del EC del interior del EMCS y apertura de éste quitando su tapa superior.
- Cortado de los cables que conectan cada cassette con el EC.
- Extracción del EC, uno a uno, de los cassettes y realización del agujero en la cubierta del cassette utilizando una herramienta o *puncturing tool*, diseñada para ello.
- Colocación de los 5 cassettes en el carrusel del *FixBox* e instalación del carrusel en la cubierta del *FixBox*
- Cerrado completo del *FixBox*
- Fijación de las muestras durante 3 horas a temperatura ambiente y almacenamiento a 4°C.

Uno de los dos *FixBox* llenados con paraformaldehído 5% en PBS fue abierto después de las tres horas de fijación a temperatura ambiente, para comprobar que el llenado de los cassettes había sido correcto y ensayar la apertura de los cassettes llenos de líquido, ya que esto no se había probado hasta ese momento.



Los otros dos FixBox fueron transportados a 4°C hasta nuestro laboratorio en Madrid (FIGURA 41), donde se abrieron comprobando que el llenado de los cassettes era el correcto y se procedió a procesar las muestras para evaluar la calidad de la fijación.



**Figura 41. OVT del Experimento *Seedling Growth* 3.** Secuencia de actividades realizadas durante el OVT incluyendo A) el llenado de las bolsas del FixBox con 50ml de la correspondiente solución fijadora, B) la preparación de los ECs con sus correspondientes etiquetas y crecimiento de las plántulas. C) El corte de los cables que unen los *cassettes* con el EC, D) la realización del agujero en la parte superior de la cubierta utilizando la *puncturing tool*, E) proceso de cerrado del *FixBox*, F) *FixBox* cerrados completamente, G) transporte de los *FixBox* a 4°C hasta Madrid y H) comprobación del llenado completo de los *cassettes* hasta el 90%-100% de su capacidad con la correspondiente solución fijadora.

El porcentaje o tasa de germinación obtenido en el OVT fue el esperado, con valores elevados comprendidos entre el 75% y el 95% (TABLA 3).

La conservación de la estructura de las muestras fijadas en glutaraldehído fue buena observando únicamente alguna irregularidad, como es la presencia de vacuolas. El resultado de la inmunofluorescencia anti-nucleolina 1 fue también muy satisfactorio, debido a la buena conservación de la antigenicidad (núcleos y nucléolo con forma redondeada) y penetración del anticuerpo primario. Las plantas DII-VENUS, al poseer una construcción reportera fluorescente, pudieron ser observadas directamente en el microscopio láser confocal, comprobándose que la señal de fluorescencia era la adecuada (FIGURA 42).

OVT-Seedling Growth 3. Tasa de Germinación	
Genotipo	% Germinación
Col-0	95
<i>aux1.7</i>	93
<i>eir1.1</i>	89
<i>tir1</i>	93
<i>nuc1</i>	75
<i>nuc2</i>	78
DII-VENUS	89

Tabla 3. Tasa de Germinación obtenida en el OVT de *Seedling Growth* 3. Porcentajes de germinación de cada genotipo a los 4 días después de la hidratación de los cassettes.

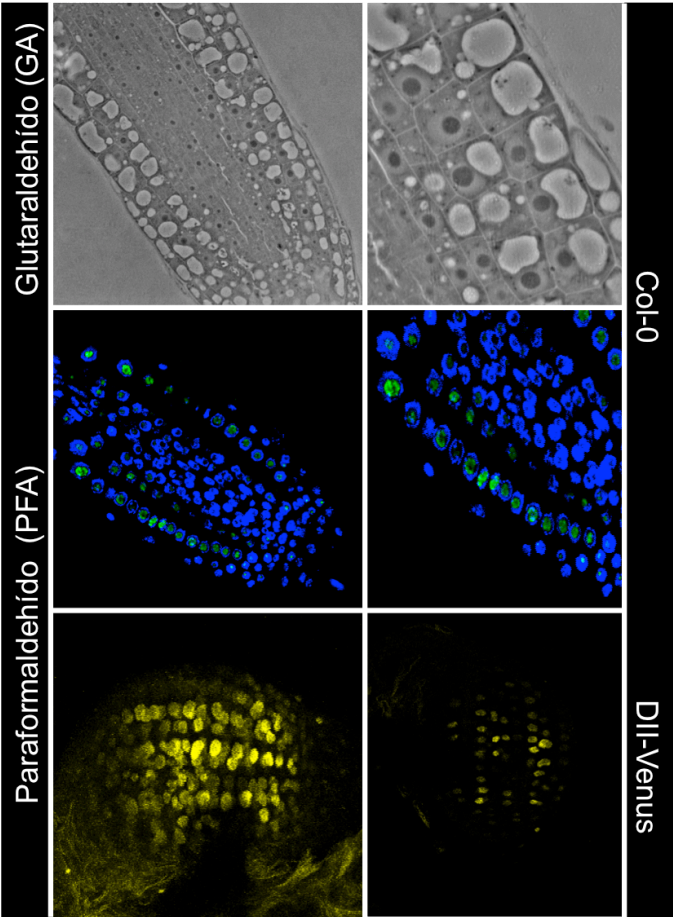


Figura 42. Plántulas fijadas en el OVT de *Seedling Growth* 3. La imagen recoge fotografías del genotipo silvestre (Col-0) fijadas en cada uno de los dos FixBox utilizados. En concreto, un ejemplo tras la fijación en glutaraldehído (GA) y su correspondiente procesamiento y un ejemplo de fijación en paraformaldehído tras la realización la inmunofluorescencia anti-nucleolinal1 (verde) y la tinción del DNA (azul). En la parte izquierda se puede observar la raíz entera y a la derecha un detalle de las células del meristemo radicular. También se muestra un ejemplo de la señal de fluorescencia de la construcción del genotipo DII-VENUS, incluyéndose la proyección máxima (izquierda) y un corte perteneciente a la zona central de la raíz (derecha).

El resultado del OVT, incluidos los aspectos tecnológicos, la germinación y crecimiento de las plantas y la calidad de la fijación, determinada por el análisis ultraestructural de las muestras, se consideró un éxito, quedando definidas las actividades y los procedimientos que se seguirían en SG3.

Los requisitos técnicos específicos de cada fase del experimento espacial *Seedling Growth* se resumen en la **TABLA 4**. En esta tabla se recogen todas aquellas etapas del experimento desde su preparación, su transporte a la ISS, su desarrollo y su vuelta a la Tierra, que requieren un requisito, ya sea de temperatura, tiempo o *hardware*, para que todo transcurriera en las mejores condiciones posibles y asegurar la obtención de resultados científicos.

Requisitos técnicos- <i>Seedling Growth</i>			
Proceso	Requisito	Tiempo	Experimento
Siembra semillas y montaje de los cassettes	Temperatura ambiente (21°C-25°C)	Máximo 3 meses antes de la hidratación	SG1/SG2/SG3
	Incorporación <i>O-ring</i>		SG3
Preparación soluciones fijadoras y llenado de la bolsas del <i>FixBox</i>	Temperatura ambiente (21°C-25°C)	Máximo 3 semanas antes de la hidratación	SG3
Almacenamiento y transporte de los <i>ECs</i>	Temperatura ambiente (21°C-25°C)	Desde su preparación hasta hidratación	SG1/SG2/SG3
Almacenamiento y transporte <i>FixBox</i>	4°C	Desde su preparación hasta hidratación	SG3
Fase crecimiento	22°C, 80%HR, Atmósfera controlada Iluminación: Luz Blanca (30-40µmol/m²s) Luz Roja 660nm (19µmol/m²s) Luz Azul 450nm (31µmol/m²s)	6 días (144h)	SG1/SG2/SG3
Etiquetado <i>FixBox</i> y <i>ECs</i>	GA: círculo verde PFA: cuadrado azul		SG3
Transferencia <i>cassettes</i> a <i>coldbag</i>	Temperatura ambiente (21°C-25°C)	Máximo 30 min	SG1/SG2/SG3
Transferencia <i>cassettes</i> a <i>FixBox</i>	Temperatura ambiente (21°C-25°C)	Máximo 45 min	SG3
Fijación en <i>FixBox</i>	Temperatura ambiente (21°C-25°C) Corte cables Agujero en cubierta Llenado 90%-100% capacidad	3 h	SG3
Almacenamiento y transporte de los <i>FixBox</i>	4°C	Desde fijación hasta llegada a Tierra Máximo 3 semanas	SG3
Almacenamiento y transporte de las <i>coldbags</i>	-80°C	Desde congelación en MELFI hasta llegada a Tierra	SG1/SG2/SG3

**Tabla 4. Resumen de los principales requisitos técnicos del experimento espacial *Seedling Growth*.** Etapas que requieren una especificación técnica para su correcta ejecución. En concreto, se especifica el proceso, su requisito, el tiempo de éste último y el experimento al que pertenece la etapa.



## 2.3. Detalles técnicos de los experimentos Espaciales SG1, SG2 y SG3

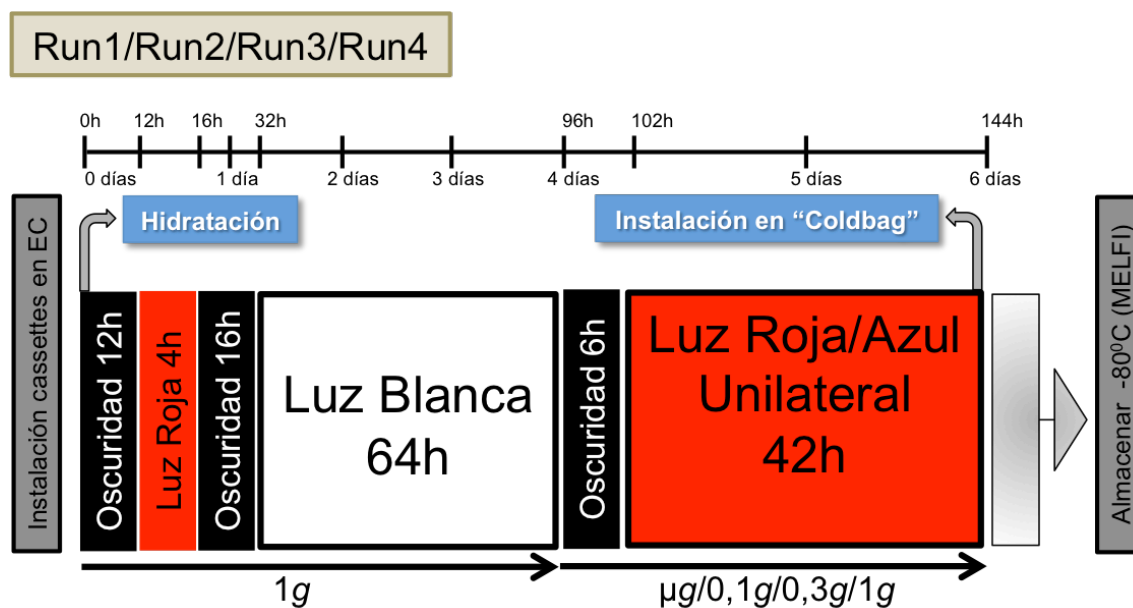
### 2.3.1. Seedling Growth 1 (SG1)

El experimento *Seedling Growth* (SG1) tuvo lugar en marzo de 2013 y fue liderado por el grupo americano dirigido por el Investigador Principal John Kiss. El objetivo principal de esta fase fue estudiar el fototropismo en ausencia de gravedad tras la estimulación con luz roja o azul.

Las líneas o genotipos de *Arabidopsis thaliana* utilizadas para este estudio fueron la línea silvestre *Landsberg erecta* (Ler) y dos líneas mutantes de fitocromos, *phyA* y *phyB*. Este experimento estuvo compuesto por 4 *runs* o etapas, realizadas de forma consecutiva e independiente utilizando un único rotor del EMCS, para evitar la contaminación lumínica entre cassettes de distintos rotores (Kiss et al. 2014).

Las condiciones lumínicas fueron, oscuridad durante las 12 primeras horas tras la hidratación, seguido de un pulso de luz roja de 4h y otras 16h de oscuridad, para después mantener una iluminación continua con luz blanca las siguientes 64h. Transcurridos estos 4 días de crecimiento y tras 6h en oscuridad, las plantas fueron fotoestimuladas con luz roja o azul durante 42h.

El nivel de gravedad durante los primeros 4 días (96h) fue de 1g, en las 4 *runs*. En cambio, fue diferente en cada una de ellas ( $\mu g/0,1g/0,3g/1g$ ) los últimos 2 días (FIGURA 43).



**Figura 43. Condiciones experimentales de Seedling Growth 1.** Parámetros de crecimiento de las plántulas en las 4 etapas que formaron este experimento, especificando los distintos periodos de iluminación, el tipo de luz, los niveles de gravedad y el tratamiento de las muestras tras su crecimiento.

Transcurrida la etapa de crecimiento de las plántulas, los cassettes fueron colocados en las *coldbags* por el astronauta y congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  en MELFI, nunca excediendo los 30min desde la parada del rotor hasta su congelación. Las muestras permanecieron almacenadas en MELFI hasta su vuelta a Tierra en mayo de 2014, en el congelador GLACIER de la cápsula *Dragon*. Tras su recogida en la costa del Océano Pacífico y ser transportadas al Centro de Investigación AMES, los cassettes se abrieron para recoger las plántulas e introducirlas en tubos con *RNAlater* (Ambion#AM7020), para un transporte y conservación estable a Madrid. Este proceso es realizado por el equipo del Investigador Principal siguiendo estos pasos:

- Sacar cassette congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$  y rápidamente inyectar 10ml de *RNAlater* a temperatura ambiente a través de una de las cuatro ventanas de la cubierta.
- Poner cassette a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 10min en un refrigerador asegurándose que todas las plántulas están sumergidas en el *RNAlater*.
- Sacar cassette del refrigerador, invertir, quitar base y recoger plántulas con pinzas e introducirlas en tubos correctamente etiquetados con 200µl de *RNAlater* previamente enfriado.
- Almacenar tubos a  $2-8^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche antes de volver a congelarlos a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Una vez recibidas las muestras en Madrid en RNA<sub>later</sub>, debido a la poca cantidad de biomasa (14 plántulas/cassette) se juntaron las raíces del mismo genotipo, que ocupaban las mismas posiciones en el EC o lo más próximas posible, y por lo tanto habían experimentado los niveles de gravedad más parecidos (*EC map*, TABLA 5), para extraer el RNA de sus tallos (cada muestra por separado) y acumular el de sus raíces. En concreto, realizamos este proceso para todas las muestras estimuladas con luz roja los últimos 2 días de crecimiento. Este procedimiento nos permitió estudiar por *real-time* RT-PCR en el RNA de las raíces, genes marcadores o implicados en: transporte de auxinas (*EIR1* y *TIR1*), proliferación celular (*CYCB1;2* y *CK2A;2*) y crecimiento celular (*FIB1*, *NUC1*). Algunas de las muestras expuestas a luz azul fueron remitidas al grupo americano (Dr. Kiss) para ser analizadas por ellos.

ECmap-Seedling Growth 1 (RUN1/RUN2/RUN3/RUN4)				
EC	Genotipo	nº semillas/cassette	Fotoestimulación	Tratamiento
EC1	Ler	14	Luz Roja	Congelación -80°C (MELFI)
	phyB	14		
	Ler	14		
	phyA	14		
	phyB	14		
EC2	phyB	14	Luz Roja	Congelación -80°C (MELFI)
	phyA	14		
	Ler	14		
	phyB	14		
	Ler	14		
EC3	Ler	14	Luz Azul	Congelación -80°C (MELFI)
	phyA	14		
	phyB	14		
	phyA	14		
	Ler	14		
EC4	Ler	14	Luz Azul	Congelación -80°C (MELFI)
	phyA	14		
	phyB	14		
	phyA	14		
	Ler	14		

**Tabla 5. EC map de Seedling Growth 1.** Posición que ocupa cada genotipo en cada EC, marcándose con colores las muestras cuyas raíces se juntaron para el análisis posterior (mismo color). También se especifica el tratamiento de luz en los dos últimos días de crecimiento y su tratamiento finalizada esta etapa. La configuración de los ECs fue la misma para las 4 runs: RUN1(μg), RUN2(0,1g), RUN3 (0,3g) y RUN4(1g).

En el experimento SG se incluyen controles 1g a bordo, pero también muestras expuestas a gravedad parcial. El nivel de gravedad nominal que sufren las muestras están, calculados para la posición intermedia del cassette, excepto para el control 1g y comprenden valores de microgravedad real (μg, con la centrifuga parada) hasta 1g (nivel de gravedad presente en la superficie de la Tierra), pasando por valores intermedios,

entre los que se encuentran los niveles de gravedad de la superficie de Marte (0,38g) y los de la superficie de la Luna (0,17g). En todos estos casos se utiliza una centrifuga a bordo que produce una fuerza proporcional a la distancia al centro de rotación. Las plántulas, según la posición que ocupe su *cassette* en el interior del EC (1 más interno a 5 más externo), están sometidas a pequeñas variaciones de los niveles de gravedad real (TABLA 6).

Posición <i>cassette</i>	$\mu g$	0,1g	0,3g	0,5g	0,8g	1g
1	0	0,07	0,21	0,34	0,55	0,52
2	0	0,08	0,25	0,42	0,68	0,64
3	0	0,1	0,3	0,5	0,8	0,76
4	0	0,11	0,34	0,58	0,92	0,88
5	0	0,13	0,39	0,65	1,05	1,00

**Tabla 6. Niveles de gravedad en las distintas posiciones del EC.** Valores reales que experimentan las muestras en función de su posición en el interior del EC. En negro se marcan las posiciones de los cassettes que sufren los valores que se corresponden con el valor de gravedad deseado. En azul se marcan los valores de gravedad próximos a los de la superficie de la Luna y en rojo los correspondientes a la superficie de Marte.

### 2.3.2. Seedling Growth 2 (SG2)

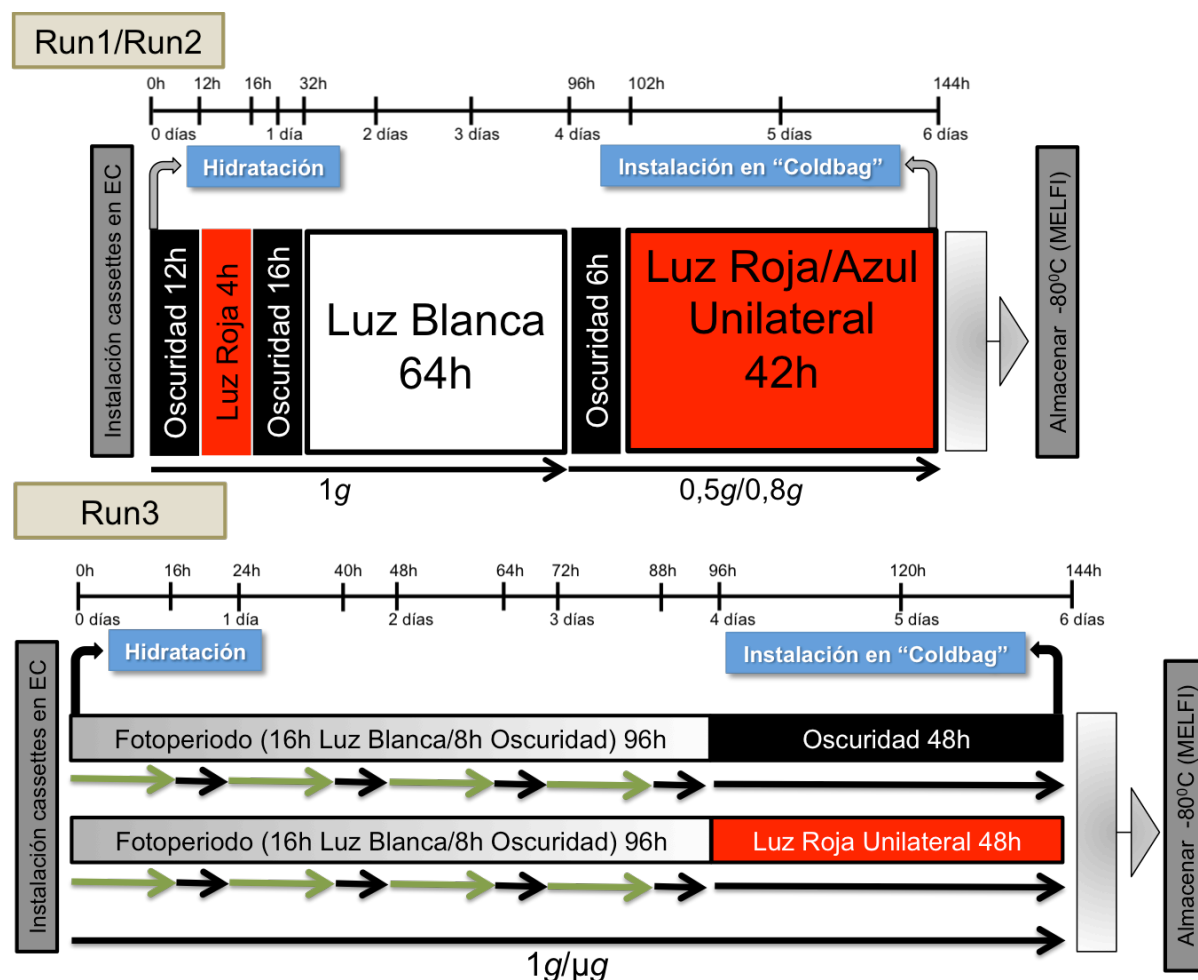
Esta fase del experimento espacial fue ejecutada en diciembre de 2014 y dirigida conjuntamente por el Dr. John Kiss (Investigador Principal del grupo americano) y el Dr. Francisco Javier Medina (Investigador Principal del grupo europeo).

Este experimento incluyó 3 *runs*, de las que las dos primeras fueron una continuación de SG1, con idéntico diseño experimental a excepción de los niveles de gravedad de los últimos dos días, que fueron: en la RUN1 0,5g y en la RUN2 0,8g (FIGURA 44).

La RUN3, en cambio, fue totalmente diferente, en relación a las líneas de *Arabidopsis thaliana*, las condiciones lumínicas y de gravedad utilizadas. El principal objetivo de esta *run* era el estudio del efecto conjunto de la ausencia de gravedad y la iluminación en el crecimiento celular y la proliferación celular. Por ello las líneas utilizadas fueron: la línea silvestre ecotipo Columbia, tres líneas mutantes en la recepción y transporte de axinas (*aux1.7*, *eir1.1* y *tir1*) y dos líneas mutantes de la proteína nucleolina (*nuc1* y *nuc2*).

En esta tercera carrera, fueron utilizados los dos rotores del EMCS simultáneamente (8 ECs), uno en condición de microgravedad real ( $\mu g$ ) y el otro en condición control (1g). Las plantas crecieron en el mismo nivel de gravedad durante los 6 días (RotorA:  $\mu g$  y RotorB: 1g), y en cuanto a la iluminación, los primeros 4 días lo hicieron con

fotoperiodo (16h Luz Blanca/8h Oscuridad), y los últimos 2 días, la mitad de las muestras fueron fotoestimuladas con una Luz Roja continua, mientras que la otra mitad permaneció en oscuridad (FIGURA 44).



**Figura 44. Condiciones experimentales de Seedling Growth 2.** Parámetros de crecimiento de las plántulas en las 2 etapas similares a SG1 (arriba) y la tercera etapa con nuevo diseño experimental que formaron este experimento, especificando los distintos periodos de iluminación, el tipo de luz, los niveles de gravedad y el tratamiento de las muestras tras su crecimiento.

Durante la ejecución de la última *run* (RUN3), se produjo un problema con la hidratación de los cassettes del EC 3 (*EC map*, TABLA 7) del control 1g (Rotor B). Estos cassettes directamente no fueron hidratados por lo que no se produjo ni la germinación ni el crecimiento de las plántulas. Después de finalizados los 6 días de crecimiento, se hizo otro intento de hidratación del EC fallido, consiguiéndose la hidratación de los cassettes, pero en condiciones de microgravedad real, por la dificultad de programar el EMCS. La consecuencia de este incidente es que no se dispone de esas muestras en la condición control 1g.

ECmap-Seedling Growth 2 (RUN3)				
EC	Genotipo	nº semillas/cassette	Fotoestimulación	Tratamiento
EC1	<i>eir1.1</i>	22	Oscuridad	Congelación -80°C (MELFI)
	<i>tir1</i>	22		
	<i>aux1.7</i>	22		
	<i>nuc1</i>	22		
	<i>nuc2</i>	22		
EC2	<i>eir1.1</i>	22	Luz Roja	Congelación -80°C (MELFI)
	<i>tir1</i>	22		
	<i>aux1.7</i>	22		
	<i>nuc1</i>	22		
	<i>nuc2</i>	22		
EC3	Col-0	22	Oscuridad	Congelación -80°C (MELFI)
	<i>nuc1</i>	28		
	Col-0	28		
	<i>nuc2</i>	28		
	Col-0	28		
EC4	Col-0	22	Luz Roja	Congelación -80°C (MELFI)
	<i>nuc1</i>	28		
	Col-0	28		
	<i>nuc2</i>	28		
	Col-0	28		

**Tabla 7. EC map de la RUN3 de Seedling Growth 2.** Cepa sembrada en cada EC. Las muestras mezcladas para la extracción de RNA (raíces) se muestran con el mismo color. Se dispone de muestras en µg y en 1g, excepto para las muestras cuya hidratación falló (Rotor B: 1g) que se muestran con letra roja.

El tratamiento de las muestras en SG2 fue exactamente el mismo que en SG1: congelación en MELFI (nunca excediendo 30min), bajada a Tierra en GLACIER, y recuperación de las plántulas en RNA*later*.

Las muestras fueron recibidas en Madrid en febrero de 2015. Con las muestras de la RUN1 y RUN2 se procedió como se ha descrito con las muestras de SG1.

Las muestras de la RUN3 de los genotipos Col-0, *nuc1* y *nuc2* fueron mezcladas siguiendo el mismo criterio que en SG1, es decir, misma posición en el EC o lo más parecida posible (TABLA 7) para que el nivel de gravedad experimentado por las muestras sea igual o lo más próximo posible. A continuación, se formaron aleatoriamente tres grupos de aproximadamente 11 plantas cada uno y se extrajo el ARN de estos grupos por separado (tres réplicas técnicas) para, por último, ser enviado para su secuenciación masiva por la técnica de RNAseq (apartado 5.4).

### 2.3.3. Seedling Growth 3 (SG3)

La última fase del experimento *Seedling Growth*, SG3, tuvo lugar en junio de 2017 y fue dirigida por el Investigador Principal europeo.

Este experimento estuvo formado por dos etapas o *runs* utilizando ambos rotores del EMCS. En concreto, las condiciones de la RUN1 fueron, en el Rotor A, microgravedad real ( $\mu g$ ) y en Rotor B, 1g (control). En cambio, en la RUN2 en ambos rotores (Rotor A y Rotor B), el nivel de gravedad fue 0,3g.

Las líneas o genotipos utilizados en este experimento fueron las mismas que en SG2, a excepción de la incorporación de la línea DII-VENUS, para estudiar el transporte de auxinas (TABLA 8). En concreto, el *EC map* del Rotor B de la RUN2 fue exactamente igual que el del RUN3 de SG2.

ECmap-Seedling Growth 3 (RUN1-Rotor A y B/RUN2- Rotor A; $\mu g$ , 1g and 0,3g respectivamente)				
EC	Genotipo	nº semillas/cassette	Fotoestimulación	Tratamiento
EC1	<i>eir1.1</i>	28	Oscuridad	Fijación (paraformaldehído 5% en PBS)
	<i>tir1</i>	28		
	DII-VENUS	28		
	<i>nuc1</i>	28		
	Col-0	28		
EC2	<i>eir1.1</i>	28	Luz Roja	Fijación (paraformaldehído 5% en PBS)
	<i>tir1</i>	28		
	DII-VENUS	28		
	<i>nuc1</i>	28		
	Col-0	28		
EC3	<i>eir1.1</i>	14	Oscuridad	Fijación (glutaraldehído 4,5%+paraformaldehído 1,5% en PBS)
	<i>tir1</i>	14		
	<i>aux1.7</i>	14		
	<i>nuc1</i>	14		
	Col-0	14		
EC4	<i>eir1.1</i>	14	Luz Roja	Fijación (glutaraldehído 4,5%+paraformaldehído 1,5% en PBS)
	<i>tir1</i>	14		
	<i>aux1.7</i>	14		
	<i>nuc1</i>	14		
	Col-0	14		

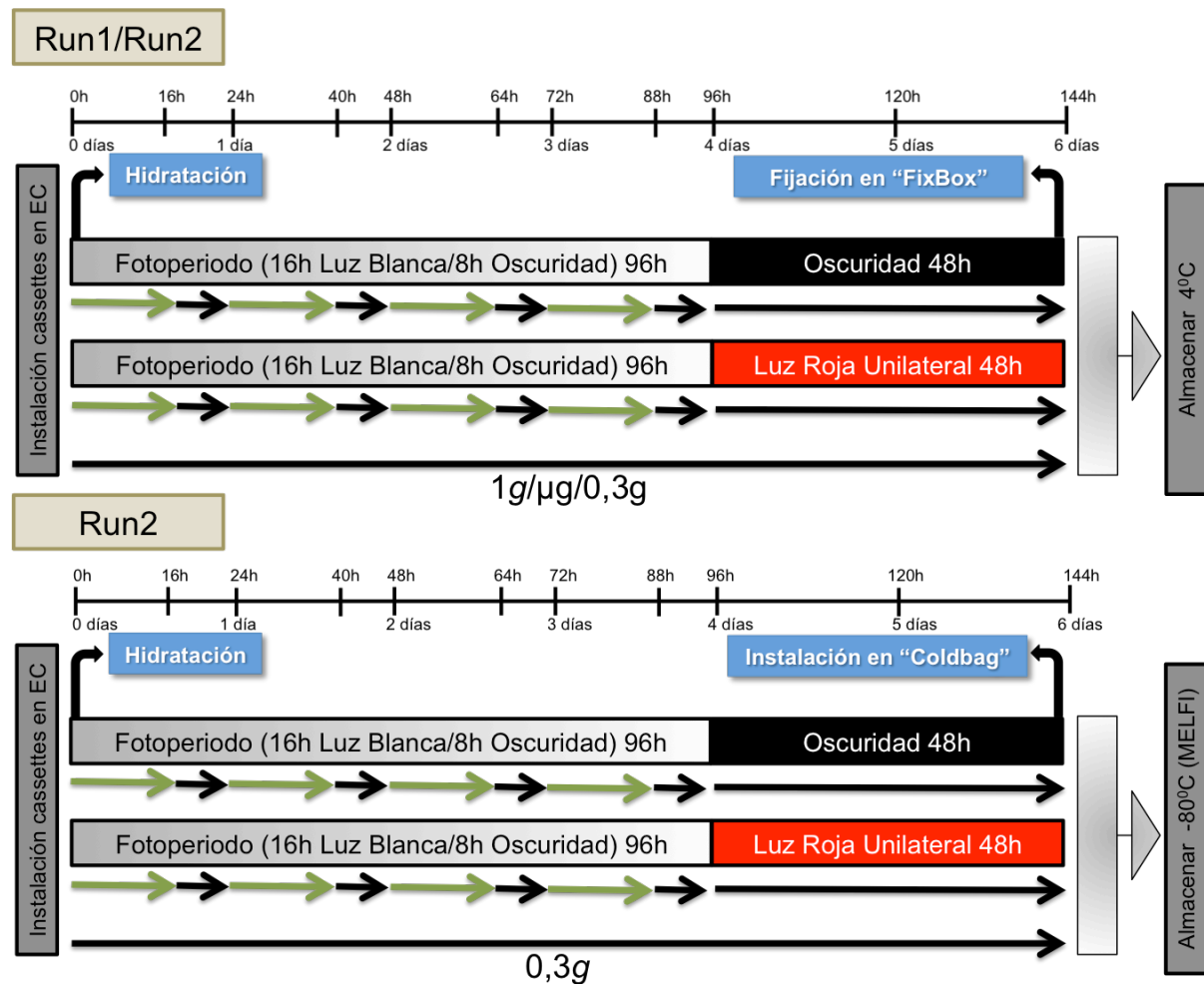
**Tabla 8. EC map Seedling Growth 3.** Posiciones que ocupa cada genotipo en la RUN 1, tanto en el Rotor A como en el Rotor B, y en la RUN2 en el Rotor A. En rojo se indica el EC cuyo FixBox no fue cerrado correctamente (muestras 1g, que fueron congeladas) y el *cassette* 1 del EC4 (muestra 0,3g) que no se hidrató.

En ambas etapas las plantas germinaron y crecieron durante los 6 días al mismo nivel de gravedad ( $\mu g/0,3g/1g$ ), pero los primeros 4 días con un ciclo continuo de 16h de luz blanca y 8h de oscuridad (fotoperiodo) y los últimos 2 días la mitad de los ECs con una continua luz roja y la otra mitad en oscuridad.

Después de la etapa de crecimiento de las plantas, todos los ECs de la RUN1 fueron introducidos en sus correspondientes *FixBox*, sin exceder los 45min desde la parada del

rotor hasta el cierre completo de los mismos, fijados 3h a temperatura ambiente y almacenados a 4°C hasta su vuelta a la Tierra.

Los ECs del Rotor A de la RUN2 fueron también fijados, como se ha descrito anteriormente, pero los ECs del Rotor B fueron congelados de igual forma que en SG1 y SG2 (FIGURA 45).



**Figura 45. Condiciones de crecimiento de las muestras de SG3.** Esquema que especifica las condiciones de crecimiento de las plantas, respecto a su iluminación, nivel de gravedad y tratamiento (fijación o congelación) después de finalizada su fase de crecimiento.

Durante el desarrollo de este experimento hubo varios problemas técnicos, que afectaron tanto a la etapa de hidratación, crecimiento y fijación. Los inconvenientes fueron los siguientes:

- La temperatura dentro del EMCS fue de entre 1,5°C-2°C inferior a la establecida en los requerimientos (22°C) durante ambas etapas (RUN1 y RUN2).
- El cierre del *FixBox* correspondiente al EC 1 del Rotor B (1g) de la RUN1 no funcionó correctamente, debido a que el astronauta no alineó correctamente la



base y la cubierta del dispositivo (TABLA 8). Por lo tanto, estas muestras no fueron fijadas con la correspondiente solución fijadora, sino congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , introduciendo el FixBox mal cerrado en MELFI.

- El cassette de la posición 1 (*air1.1*) del EC 4 del Rotor A (0,3g) de la RUN2 (glutaraldehído 4,5%+paraformaldehído 1,5% en PBS) no fue hidratado, por lo que no se produjo ni la germinación ni el crecimiento de estas plantas perdiéndose esas muestras.
- El sistema de renovación de aire y mantenimiento de la humedad relativa (RH) o *airflow* no funcionó correctamente durante la fase de crecimiento. En concreto, las posiciones donde este sistema falló, fueron: el EC 3 del Rotor A y el EC 1 del Rotor B durante la RUN1 y 2, y además el EC 4 del Rotor A solo durante la RUN2.

Las muestras, tras ser recuperadas en el Océano Pacífico tras el amerizaje de la cápsula espacial, fueron transportadas al centro ARC de la NASA. El equipo del Investigador Principal, que se trasladó a California, procesó las muestras hasta una etapa estable para su envío a Madrid. Las muestras congeladas, tanto las del Rotor B de la RUN2 como las que volvieron en el *FixBox*, fueron recogidas e introducidas en *RNAlater* siguiendo el protocolo descrito para SG1.

Los *FixBox* que contenían las muestras fijadas, fueron abiertos de uno en uno con ayuda del ingeniero de NTE-SENER, al igual que los cassettes, y las plantas fueron introducidas en tubos previamente etiquetados y llenados con 2ml de PBS 1X, sin dejar o dañar ninguna de ellas en el proceso. A continuación, se realizaron tres lavados de 10 min cada uno con PBS 1X.

Las muestras fijadas con glutaraldehído 4,5%+paraformaldehído 1,5% en PBS se conservaron en PBS a  $4^{\circ}\text{C}$  (después del último lavado en PBS) hasta y durante su traslado a Madrid, donde se finalizó el protocolo descrito en el apartado 4.2.1.2.

Las muestras fijadas en paraformaldehído 5% en PBS, fueron lavadas y posteriormente digeridas con el cóctel de enzimas, lavadas, y procesadas colocando las raíces y los tallo por separado en portaobjetos con Poly-L-lisina y deshidratadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  con metanol 100% (protocolo apartado 2.3.1). En este paso, los portaobjetos a  $-20^{\circ}\text{C}$  fueron transportados a Madrid, donde se continuó con las correspondientes inmunofluorescencias (apartado 4.3.2) o tinción con Reinassance (apartado 4.3.3).

### 3. Experimentos realizados en instalaciones de Simulación de Microgravedad en Tierra (Ground Based Facilities, GBF) europeas

La experimentación en microgravedad real es muy cara y apenas disponible, por lo que existen diversas plataformas que proporcionan, en la Tierra, condiciones experimentales comparables con la microgravedad real. Ejemplos de diferentes instalaciones en Tierra (GBF) para simular condiciones de microgravedad son los clinostatos 2D, clinostatos 3D o *Random Positioning Machine* (RPM) y levitadores magnéticos. También existen centrifugas diseñadas específicamente para estudios de hipergravedad.

En esta memoria se da cuenta de experimentos realizados en dos máquinas RPM localizadas en el centro de investigación de la ESA, ESTEC (*European Space Research and Technology Centre*), en Noordwijk (Holanda) y en la *Faculté de Médecine* de la *Université III-Paul Sabatier* en Toulouse (Francia).

#### 3.1. Modos de uso de la Random Positioning Machine (RPM)

La *Random Positioning Machine* (RPM) es una instalación en Tierra o *Ground-Based Facility* (GBF) capaz de simular los efectos de la microgravedad ( $10^{-4}$ - $10^{-6} g$ ). Este instrumento está formado por dos ejes o marcos perpendiculares que pueden girar de forma independiente, al poseer cada uno un motor, y una plataforma donde se colocan las muestras biológicas.

El principio de funcionamiento de la RPM se basa en la rotación aleatoria de la muestra biológica por el giro de estos dos ejes, de manera que se produce un cambio continuo en la orientación relativa del vector gravedad, dejando de ser percibido por el ser vivo. La calidad de la microgravedad simulada depende del patrón y velocidad de rotación y disminuye con la distancia de la muestra con respecto al centro de la plataforma experimental (Hoson et al. 1997; Borst y Van Loon 2009).

El efecto generado en esta instalación es comparable al producido por la microgravedad real cuando el cambio en la dirección del vector es más rápido que el tiempo de respuesta de la muestra biológica. Este dispositivo no elimina la fuerza de la gravedad presente en la Tierra

9,8m/s<sup>2</sup> o 1g), pero el cambio continuo en la dirección del vector provoca que el objeto biológico se comporte como si no existiese y suprima la respuesta. Por ello, es un buen simulador para muestras u objetos de gran tamaño y respuesta lenta, como son las plantas (Herranz et al. 2013). No obstante, pueden existir, dependiendo de la velocidad de giro de los ejes y la distancia de la muestra al centro de rotación, niveles residuales de gravedad o fuerzas centrífugas no deseadas.

Atendiendo a todos estos aspectos, los experimentos realizados en esta instalación se realizaron con una velocidad de giro (velocidad angular,  $\omega$ ) de ambos ejes a 60°/s y la muestra se colocó a una distancia del centro de  $\pm 5$ cm, siendo el nivel de gravedad residual equivalente percibido por la muestra en estas condiciones de 10<sup>-4</sup>g (van Loon 2007). Este modo de operación de la RPM es también llamado modo regular de funcionamiento o condiciones estándar (FIGURA 46).

Puesto que el crecimiento de las plantas necesita de una temperatura y humedad determinada, las condiciones ambientales de microgravedad simulada deben acompañarse del control de estos otros parámetros ambientales. Para facilitar su uso en diversos incubadores, con un control medioambiental completo, se ha utilizado una RPM portátil (Huijser 2000) instalada en una cámara de cultivo.

Además de la realización de experimentos en microgravedad simulada, hemos participado en el desarrollo de dos métodos de simulación de niveles de gravedad parcial, similares a los presentes en la Luna o Marte, usando la RPM, cuyos experimentos piloto se describen en esta memoria.

El primero de ellos se basa en la neutralización de la gravedad por un *software* que controla el tiempo medio específico de orientación de las muestras en cada dirección (RPM<sup>SW</sup>). Es decir, el *software* cambia la distribución de puntos uniformes de la esfera, resultado del modo de funcionamiento regular de la RPM, para formar un esferoide. En otras palabras, dentro del movimiento aleatorio, la muestra pasa más tiempo en una determinada orientación/dirección, lo que da como resultado un nivel promedio de gravedad entre 0g y 1g teórico (FIGURA 46).

La distribución del vector gravedad sobre un esferoide de excentricidad 0 (una esfera perfecta) corresponde a un vector de gravedad 0g. En cambio, un esferoide de excentricidad 0,25 resulta en un vector gravedad de valor 0,17g (gravedad en la Luna) y

un esferoide de excentricidad 0,53 se corresponde con un vector gravedad de valor 0,38g (gravedad en Marte) (TABLA 9).

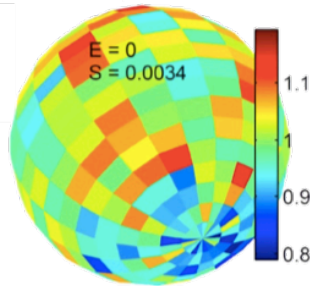
El segundo método se basa en la premisa de que cuando la RPM opera de forma regular simula prácticamente ingravidez, y tomando ese nivel de gravedad como base se puede aplicar centrifugación para simular cualquier nivel de gravedad deseado (RPM *hardware*, RPM<sup>HW</sup>) (FIGURA 46). En concreto, se ha incorporado una centrífuga en la plataforma (500x500mm) de la RPM de gran diámetro que, dependiendo de su velocidad de giro (rpm) y distancia de la muestra desde el centro de la misma, puede simular niveles de gravedad comprendidos entre 0g y 2g (TABLA 9).

Condición simulada	Aceleración (nivel de gravedad)	RPM <sup>SW</sup>	RPM <sup>HW</sup>	
		Excentricidad	Velocidad angular (rpm)	Radio (cm)
<b>Luna</b>	0,17	0,25	36	12
<b>Marte</b>	0,38	0,53	53	12
<b>½ g</b>	0,50	0,66	53	16
<b>¾ g</b>	0,75	0,87	75	12
<b>1g HW control</b>	1,00	-----	75	16

**Tabla 9. Condiciones de simulación de niveles de gravedad parcial por los métodos RPM<sup>SW</sup> y RPM<sup>HW</sup>.** La excentricidad del esferoide para cada nivel de gravedad simulado por RPM<sup>SW</sup> es mostrado, como la velocidad de giro y la distancia a la que debe estar colocada la muestra del centro de la centrífuga para esos mismos valores, mediante el método de simulación RPM<sup>HW</sup>.

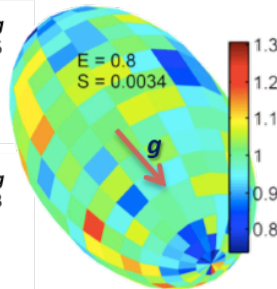
### A) Microgravedad simulada, RPM regular

FUERZA NETA  $0g$   
excentricidad = 0  
sigma = 0.0034  
mean = 0.020

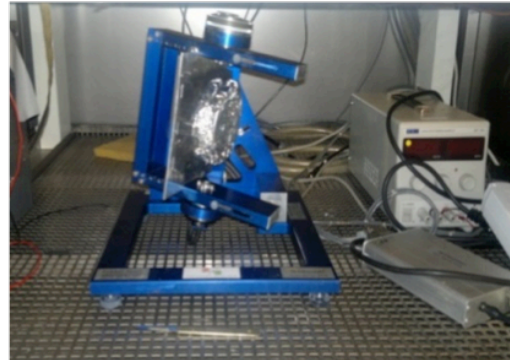


### B) Gravedad parcial simulada, RPM<sup>SW</sup>

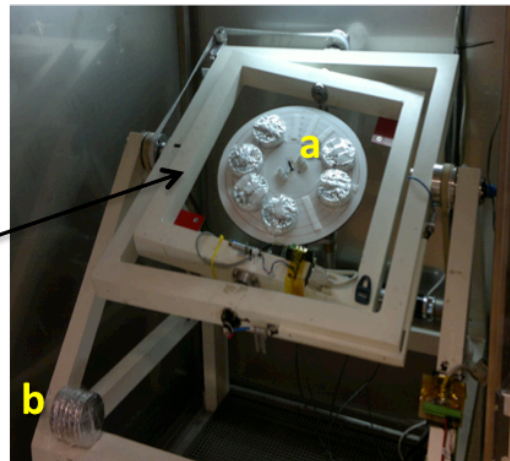
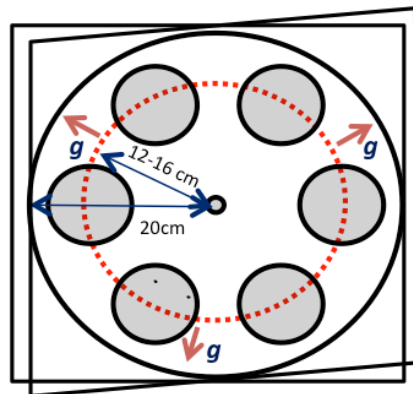
FUERZA NETA  $0,17g$   
excentricidad = 0.25  
sigma = 0.0034  
mean = 0.0049



FUERZA NETA  $0,38g$   
excentricidad = 0.53  
sigma = 0.0034  
mean = 0.0049



### C) Gravedad parcial simulada, RPM<sup>HW</sup>



**Figura 46. Diferentes métodos de simulación de gravedad parcial.** A) RPM de gran diámetro en modo de funcionamiento regular o estándar (excentricidad 0, nivel de gravedad= $0g$ ) con las muestras localizadas en el centro de rotación. B) Método de simulación de gravedad parcial mediante la utilización de un *software* o RPM<sup>SW</sup> que controla la velocidad y el ángulo de giro respecto al vector gravedad de la Tierra. C) RPM adaptada para simular niveles de gravedad parcial mediante el método RPM<sup>HW</sup> o instalación de una centrífuga en su interior de 20cm de radio con líneas que marcan la posición exacta que deben ocupar las muestras para los distintos niveles de gravedad. Además, se observa muestras experimentales localizadas en la centrífuga (a) y el control estático  $1g$  (b) localizado en la estructura de la RPM en el mismo incubador.

### 3.2. Condiciones y diseño experimental en la RPM de ESTEC

En este experimento se utilizaron cuatro líneas de *Arabidopsis thaliana*: la línea silvestre o *wildtype* ecotipo Columbia (Col-0), las dos líneas defectivas en la proteína nucleolina (*nuc1* y *nuc2*) y la línea reportera *CYCB1;1:uidA*.

En las instalaciones de ESTEC las semillas de cada una de estas líneas fueron esterilizadas, como se ha descrito para el experimento espacial, y colocadas en fila a 12cm o 16cm del centro de la centrífuga en placas Petri (9cm de diámetro), con medio de cultivo, previamente preparadas.

El medio de cultivo utilizado fue el mismo que en *Seedling Growth* (Murashige and Skoog), pero suplementado con sacarosa (10g/l) y añadiendo agar al 0,8% (p/v) como soporte para las semillas.

Una vez sembradas las semillas, fueron estratificadas a 4°C durante 48h en oscuridad e introducidas en la correspondiente máquina:

- RPM en funcionamiento en las condiciones estándar (máxima aceleración 60<sup>0</sup>/s, con dirección e intervalo aleatorios) para obtener microgravedad simulada (sim  $\mu g$ )
- RPM<sup>SW</sup> con software que modifica la posición y dirección de la muestra para obtener el nivel de gravedad residual o parcial deseada (0,17g y 0,38g)
- RPM<sup>HW</sup> o con *hardware* modificado por la incorporación de una centrífuga, que puede simular distintos valores de gravedad parcial: 0,17g, 0,38g, 0,5g, 0,75g y 1g.
- Control estático 1g colocado en la estructura de la RPM, quedando las placas en posición vertical.

Las tres máquinas se encuentran en el mismo incubador, lo que permitió que las semillas germinaran y la plántulas crecieran en las mismas condiciones, a 22°C con un 80% de humedad relativa en oscuridad durante 4 días (Ver CD).

Tras el periodo de crecimiento a los distintos niveles de gravedad todas las plantas fueron rápidamente introducidas en solución fijadora, en un tiempo máximo de 15min desde la parada de la RPM. En el caso de las líneas Col-0, *nuc1* y *nuc2* la mitad de ellas fueron introducidas en una solución de glutaraldehído 3% (v/v) en PBS 1X, y la otra

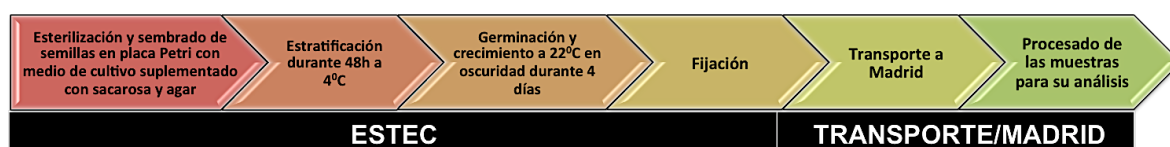
mitad en una solución de paraformaldehído 4% (v/v) en PBS 1X. Las plantas de la línea *CYCB1;1:uidA* fueron introducidas en acetona 90% (v/v).

Las muestras introducidas en glutaraldehído y paraformaldehído fueron fijadas 3h a temperatura ambiente y posteriormente almacenadas a 4°C hasta y durante su transporte a Madrid.

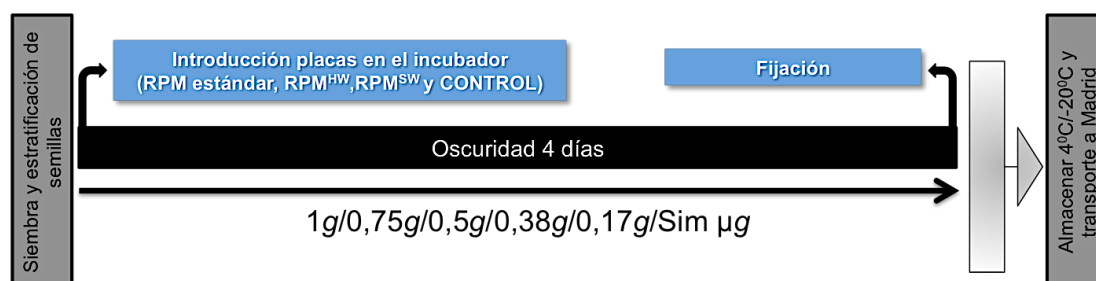
Las muestras fijadas en acetona fueron inmediatamente introducidas a -20°C y almacenadas y transportadas a Madrid en esa misma temperatura.

Una vez en el laboratorio se continuó, con las muestras fijadas en glutaraldehído con el protocolo descrito en el apartado 4.2.1.1 para su estudio morfométrico, con las muestras fijadas en paraformaldehído con el protocolo descrito en el apartado 4.3.1, para su posterior inmunofluorescencia (apartado 4.3.2), y con las muestras en acetona se llevó a cabo la tinción histológica GUS (apartado 4.1) (FIGURA 47).

**A**



**B**



**Figura 47. Diseño experimental del experimento realizado en ESTEC.** Protocolo seguido especificándose las condiciones de crecimiento de las plantas, así como el lugar en el que se realizó cada operación.

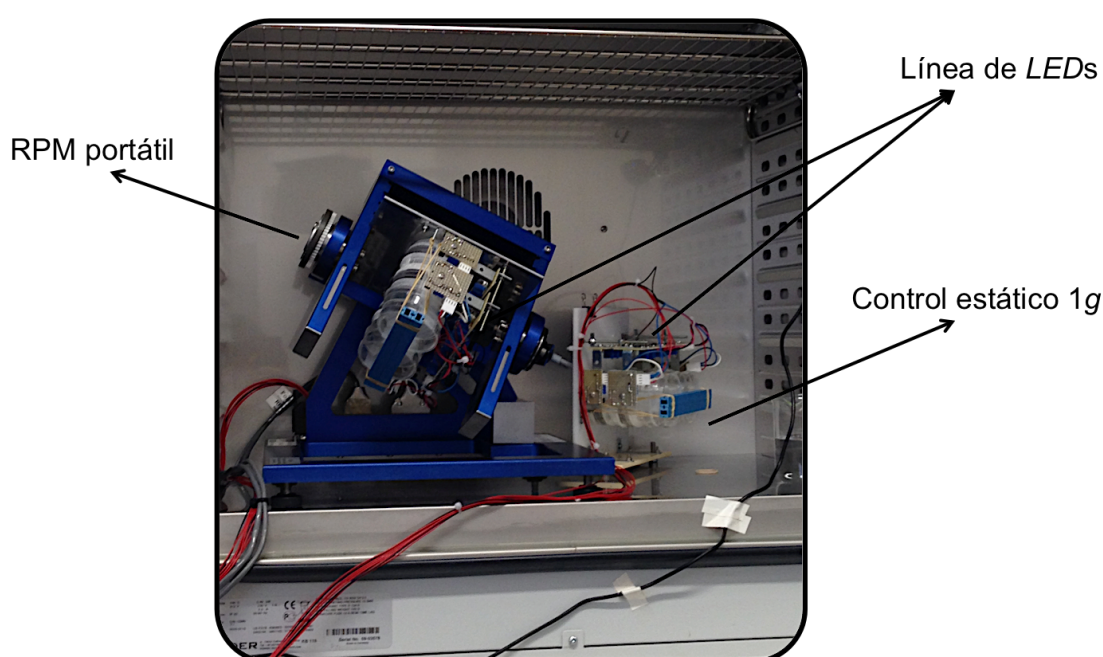
### 3.3. Condiciones y diseño experimental en la RPM de Toulouse

En estas instalaciones solo hay disponible una RPM portátil que utilizamos en el modo standard (*Real random mode*), por lo que todos los experimentos llevados a cabo en ella, son en condiciones de microgravedad simulada, pero permite la iluminación de las muestras, al tener instalados *LEDs* de distinta longitud de onda en su interior. Esto hace



posible crecer plantas con distintas condiciones lumínicas o ser fotoestimuladas porque las luces giran a la vez que lo hace la muestra. También hay disponible un soporte para el control 1g con las mismas luces y a la misma altura que en la RPM, para que las plántulas que crecen en esta condición lo hagan igual que en las condiciones experimentales, pero en posición estática vertical (FIGURA 48).

Además, en estas instalaciones está disponible un dispositivo que permite someter a las muestras a la misma dosis de radiación que la existente en el interior de la ISS (0,4 mGy/día (Maalouf et al. 2011).



**Figura 48. RPM instalada en el laboratorio de la Facultad de Medicina de la Universidad Paul Sabatier de Toulouse.** La RPM se encuentra en el interior de un incubador que controla la temperatura y la humedad, y junto a ella se localiza el soporte para el control estático 1g. Ambos poseen una línea de luces LEDs en la parte superior, que permite que las plantas puedan crecer con distintos tratamientos lumínicos.

Las semillas se sembraron en nuestro laboratorio en Madrid como se describe en el apartado 2.1.3.2 (seleccionadas siguiendo los criterios de SG y con Goma Guar en membrana de nitrocelulosa) en dos filas (100 semillas/fila) si el tratamiento posterior a la fase de crecimiento es la congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$  para un análisis transcriptómico, o en una fila (30 semillas/fila) si el tratamiento posterior es la fijación para su análisis estructural. Una vez sembradas todas las semillas en su correspondiente membrana de nitrocelulosa, éstas fueron almacenadas a temperatura ambiente en oscuridad y trasladadas a Toulouse en estas mismas condiciones.



Las líneas y genotipos de *Arabidopsis thaliana* utilizadas para el análisis transcriptómico fueron la línea *wildtype* (Col-0) y las líneas mutantes *nuc1* y *nuc2*. Las líneas utilizadas para el estudio morfológico y estructural de la raíz fueron las tres líneas anteriores más las líneas reporteras, *CYCB1;1:uidA* y DII-VENUS.

En todos los experimentos las plantas germinaron y crecieron en el mismo medio de cultivo, *Murashige and Skoog*, no suplementado con sacarosa, pero sí conteniendo un 0,8% (p/v) de agar, en placas Petri de 6cm de diámetro, preparadas en Toulouse.

Por último, la membrana con las semillas es colocada sobre el medio de cultivo solidificado y las placas son mantenidas a 4°C durante 48h (estratificación). Tras lo cual son introducidas en la RPM o en el soporte para el control 1g, instalados en el interior de un incubador, momento en el que se inicia el experimento (germinación) a 22°C con un 80% de humedad relativa durante 6 días (FIGURA 49).

Después del periodo de crecimiento las placas con 200 semillas (100 semillas/fila) fueron directamente introducidas a -80°C y almacenadas hasta su transporte a Madrid en nieve carbónica. Las placas con 30 semillas fueron abiertas para ser fotografiadas (posterior medición de la longitud de raíz de esas imágenes), recolectar las plantas e introducirlas rápidamente (tiempo máximo 15min) en las correspondientes soluciones fijadoras: Col-0, *nuc1*, *nuc2* y DII-VENUS fueron sumergidas en paraformaldehído 5% en PBS 1X, mientras que la línea *CYCB1;1:uidA* fue introducida en acetona 90% (v/v).

Las plantas sumergidas en paraformaldehído fueron fijadas durante 3h a temperatura ambiente y almacenadas a 4°C hasta y durante su traslado a Madrid, y las plantas en acetona fueron directamente almacenadas a -20°C y mantenidas a esta temperatura hasta su llegada al laboratorio.

Una vez en el laboratorio de Madrid, las muestras congeladas fueron diseccionadas separándose la parte aérea de la raíz, se extrajo el RNA de las dos partes independientemente (apartado 5.1), y se estudió el proceso de biogénesis de ribosomas por RT-PCR (tallos) y *real-time* RT-PCR (raíz) (apartados 5.2 y 5.3 respectivamente). Además, de estudiar solo en la raíz por *real-time* RT-PCR, el transporte de auxinas (*EIR1* y *TIR1*), proliferación celular (*CYCB1;2* y *CK2A;2*), crecimiento celular (*FIB2*, *NUC1* y *NUC2*) y biogénesis de ribosomas (*5'ETS*, *3'ETS* y *25S*) (apartado 5.3).

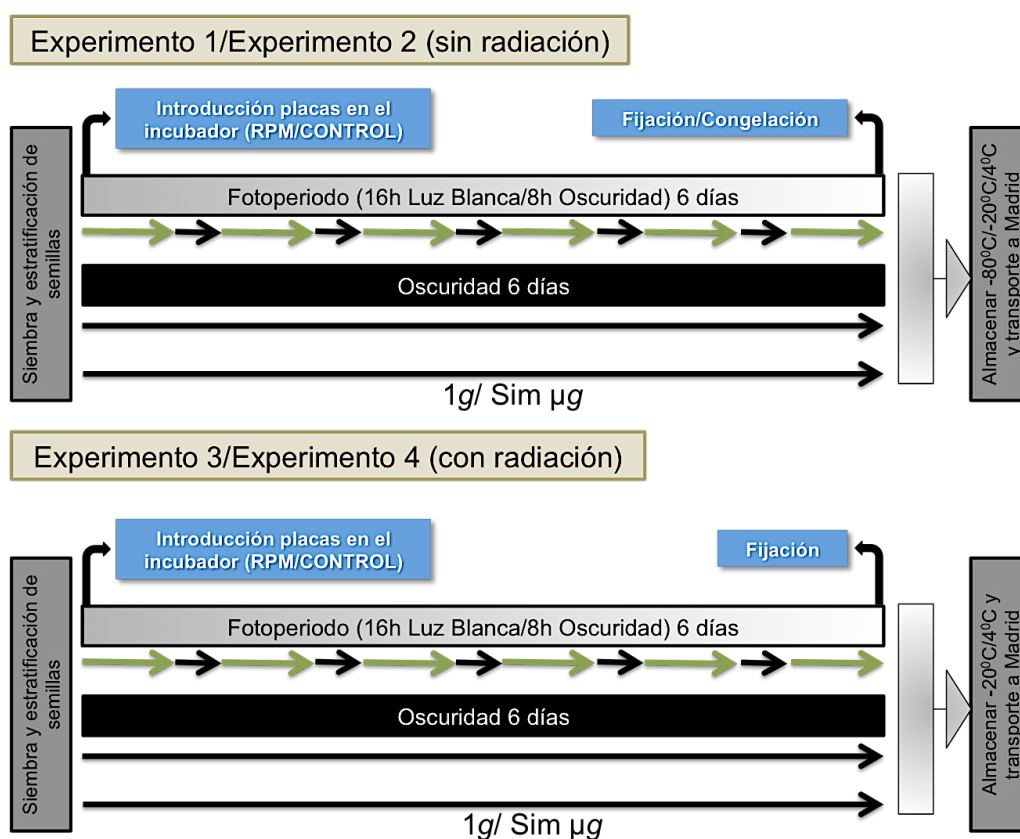
Las muestras de los genotipos Col-0, *nuc1* y *nuc2* fueron divididas para que una parte fuera teñida con Reinassance (apartado 4.3.3) y con la otra parte se realizara inmunofluorescencia anti-fibrilarina. (apartado 4.3.2)

Las plántulas de la línea DII-VENUS fueron teñidas con Reinassance para localizar las células con la señal de fluorescencia de la construcción, y las plántulas de la línea *CYCB1;1:uidA* fueron sometidas a tinción histológica para revelar la actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) fusionada con el promotor del gen de la ciclinaB1 (apartado 4.1) (FIGURA 49).

A



B



**Figura 49.** Diseño experimental de los experimentos realizados en la RPM de Toulouse. Lugar de realización de las distintas etapas del experimento y sus condiciones.

En este simulador se realizaron varios experimentos que difieren únicamente en el tratamiento lumínico que sufren las muestras y si son o no irradiadas. Estas condiciones se recogen en la siguiente tabla (TABLA 10):

Experimento	nºréplicas muestras congeladas/fijadas	Condiciones de crecimiento	Condiciones lumínicas	Radiación	Tratamiento tras el periodo de crecimiento
1	3/1	22°C, 80% HR durante 6 días	Fotoperiodo	No	Fijación/Congelación
2	3/1		Oscuridad		
3	--/1		Fotoperiodo	Si	Fijación
4	--/1		Oscuridad		

**Tabla 10. Condiciones de los distintos experimentos realizados en la RPM de Toulouse.** Tabla que recoge las condiciones de crecimiento, iluminación, radiación y tratamiento tras la etapa de crecimiento de los distintos experimentos, además del número de réplicas biológicas realizadas en cada de ellos.

## 4. Técnicas de microscopía

Las muestras fijadas en las diferentes soluciones fijadoras como, glutaraldehído, paraformaldehído y acetona sirvieron para su estudio y caracterización estructural por técnicas de microscopía, tanto óptica y electrónica como por microscopía láser confocal.

### 4.1. Análisis histoquímico de la actividad $\beta$ -glucuronidasa (GUS) en líneas transformadas

La línea *CYCB1;1:uidA* posee el gen reportero GUS o *uidA*, que codifica para la enzima  $\beta$ -glucuronidasa, por lo que al añadir su sustrato específico (X-Glc A) el resultado es una coloración azul en los tejidos donde se activa el promotor y se está expresando el gen permitiendo la visualización *in situ* al microscopio de la actividad de dicho promotor, en este caso, el de la ciclina B1.

Las plantas con esta construcción se fijaron con acetona (Merck#1.00014.1000) al 90% (v/v) a -20°C durante toda la noche o hasta su traslado a Madrid. A continuación, tras dos lavados de 10min cada uno con tampón fosfato sódico 100mM, fueron incubadas con la solución de revelado de la actividad GUS a 37°C en oscuridad durante toda la noche. La solución de revelado está compuesta por ferrocianuro potásico trihidratado 5mM (Sigma#P9387), ferrocianuro potásico 5mM (Sigma#P8131), tampón fosfato sódico 100mM y 5-bromo-4-cloro-3-indolyl  $\beta$ -D-ácido glucurónico (X-Glc A) (Duchefa#X1405.0100). Una vez transcurrido el tiempo de incubación las muestras

fueron lavadas tres veces (10min/lavado) con tampón fosfato sódico 50mM y montadas con glicerol (Merck#1.04094.1000) en portaobjetos.

Estas preparaciones fueron visualizadas al microscopio (Leica DM2500) acoplado a una cámara digital CCD Leica DFC320, para tomar fotografías en microscopía óptica de campo claro, en las mismas condiciones, en cuanto al software de captura (saturación, brillo y ganancia) y en cuanto a los ajustes del microscopio (aumento x20, apertura de diafragma e iluminación).

Por último, estas imágenes se procesaron y se cuantificaron utilizando el programa ImageJ 1.49u (imagejdev.org) midiendo el área de la zona teñida de azul y su densidad óptica (D.O), obteniéndose la densidad óptica integrada (D.O.I= área teñida x densidad óptica D.O). Se utilizaron como control negativo zonas no teñidas del campo microscópico. Las medidas de densidad óptica se normalizaron frente a estos controles.

## **4.2. Técnicas de microscopía electrónica de transmisión**

### **4.2.1. Preparación de las muestras**

#### 4.2.1.1. Método de Metilación-Acetilación

Las plántulas fueron fijadas con glutaraldehído (Sigma#G5882) al 3% (v/v) en tampón fosfato salino (PBS, pH: 7,2) durante 3h a temperatura ambiente. A continuación, fueron lavadas tres veces con PBS (10min/lavado) y deshidratadas con una solución de metanol (Merck#1.06009.2500) al 30% (v/v) durante 30min a temperatura ambiente, seguido de otro lavado con metanol al 50% (v/v) en las mismas condiciones y un último lavado con metanol al 70% durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se continuó con la deshidratación con metanol al 100% (3 lavados de 30min cada uno) y las muestras se dejaron toda la noche en una solución de metanol-anhídrido acético 5:1 (v/v) a temperatura ambiente (Testillano et al. 1991, 1995). Por último, fueron lavadas tres veces con metanol 100% durante 30min cada vez y se procedió a la infiltración de las muestras en resina LR White (London Resin Company): las plántulas se incluyeron progresivamente, pasando 2h en una mezcla de etanol 100% y resina en proporción 2:1 (v/v), seguido de 2h en proporción 1:2, antes de pasarlas a resina pura (con dos lavados al día con resina fresca durante 2 o 3 días).

Finalmente, una vez infiltradas, se cortó la parte terminal de cada raíz y se incluyeron en cápsulas de gelatina (TAAB#C091/1) con LR White orientándolas transversalmente en el fondo. La polimerización se realizó a 60°C durante 22h.

### 4.2.1.2. Método post-fijación con Tetróxido de Osmio ( $\text{OsO}_4$ )

Las plántulas fijadas durante 3h a temperatura ambiente en glutaraldehído 4,5% (v/v)+ paraformaldhído (EMS#15710) 1,5% (v/v) en PBS 1X, fueron lavadas tres veces durante 10min con PBS y post-fijadas con una solución de  $\text{OsO}_4$  (Ted Pella#18459) al 1% en  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  durante 1h a temperatura ambiente (Stockert y Colman 1974). Después, se eliminó el osmio con dos lavados con  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  de 15min cada uno, y las muestras fueron deshidratadas con una serie de diluciones de etanol (Merck#1.00983.1000) de concentración ascendente: primero con etanol 25% (v/v) durante 30min a temperatura ambiente, seguido de etanol 50% (v/v) en las mismas condiciones y etanol 70% (v/v) durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente la deshidratación continuó con lavados sucesivos con etanol 80% (v/v), etanol 95% (v/v) y etanol 100%, cada uno durante 30 min a temperatura ambiente.

Tras la deshidratación total de las plántulas, éstas fueron infiltradas en resina Epon, previamente preparada por la mezcla de sus cuatro componentes (EMBED812 EMS#14900, Araldite GY 502 EMS#10900, DDSA EMS#13710 y DMP30 EMS#3013600) con agitación durante 2h a temperatura ambiente. Esta infiltración se produjo por la inmersión de las muestras en una serie de mezclas de Epon y etanol 100% en distintas proporciones (1:2, 1:1, 2:1) durante 1h a temperatura ambiente. Por último, la infiltración fue finalizada por la inmersión de las muestras en resina pura durante el mismo tiempo y a la misma temperatura. Finalmente las muestras fueron incluidas en cápsulas de gelatina y la resina polimerizó a 60°C durante 48h.

### **4.2.2. Microscopía óptica sobre cortes**

Las raíces incluidas en cápsulas de gelatina en las diferentes resinas fueron procesadas para su observación en el microscopio. Se realizaron cortes semifinos de las muestras (2µm de grosor) con el LKB Pyramitome-11800, los cuales fueron recogidos en una gota de agua en un portaobjetos y, tras la evaporación del agua por aplicación de calor, fue

añadido sobre dicho corte el medio de montaje Permount (EMS#17986-01). Una vez montada la muestra se observó el corte al microscopio óptico por contraste de fases (Leica DM2500) y se tomaron imágenes (cámara CCD Leica DGC320).

Las imágenes de la raíz sirvieron para analizar la calidad de la fijación (preservación estructural de las células), seleccionándose las zonas mejor preservadas para el estudio por microscopía electrónica, y para cuantificar, en las tres capas de células meristemáticas, que aparecen en los cortes microscópicos como alineaciones longitudinales de células, el número de células por milímetro, también llamado el *ratio* local de producción celular (Beemster y Baskin 1998) (parámetro indicador de la proliferación celular) con el *software* ImageJ 1.49u.

#### **4.2.3. Tallado, ultramicrotomía y tinción para microscopía electrónica de transmisión**

Tras la observación y la elección de la zona en el corte semifino, se talló una pirámide (LKB Pyramitome-11800) cercando esta zona, para realizar a continuación cortes ultrafinos con el ultramicrotomo Reichert Ultracut E. Los cortes ultrafinos se montaron en rejillas de níquel recubiertas con una película de Formvar 0,5% (TAAB#15820).

A continuación los cortes ya montados en las rejillas, fueron teñidos durante 30 min en acetato de uranilo 5% (p/v) y en citrato de plomo al 0,3% (p/v) durante un minuto y medio. Entre ambas tinciones las rejillas se lavaron con agua.

Las muestras se observaron en el microscopio de transmisión JEOL 1230, a 100kV de tensión de aceleración. Las imágenes tomadas se digitalizaron y fueron utilizadas para estudiar en detalle la ultraestructura del nucleolo, cuantificando su área y la distribución de sus subcomponentes con el programa ImageJ 1.49u.

### **4.3. Microscopía confocal**

#### **4.3.1. Preparación de las muestras**

Las muestras fueron fijadas en paraformaldehído al 4% (v/v) o al 5% (v/v) en PBS (1X pH:7,2) (EMS#15710) durante 3h a temperatura ambiente y después lavadas tres veces con PBS durante 10min cada vez. A continuación, las plántulas fueron digeridas con un cóctel de digestión de paredes celulares durante 1h a 37°C. El cóctel de digestión está

compuesto por celulasa 2% (p/v) (Sigma#1794), pectinasa 1% (p/v) (Sigma#17389), macerozima 0,05% (p/v) (Serva#28302), manitol 0,4% (p/v) (Sigma#M4125), glicerol 10% (v/v) (Merck#1.04094.1000) y Triton X-100 (Sigma#T9284) 0,2% (v/v).

Tras la digestión las muestras fueron lavadas tres veces (10min/lavado) con una solución de [PBS1X + glicerol 10% (v/v) + Tritón X-100 0,2% (v/v)]. A continuación, con ayuda de la lupa (Leica EZ4) se colocaron las muestras (raíces o tallos) en portaobjetos con 8 pocillos (EMS#63422-06) previamente tratados con poli-L-lisina (Sigma#P8920), y fueron deshidratadas con una gota de metanol 100% exponiéndolas a -20°C como mínimo durante 30 min (evaporación completa del metanol).

### 4.3.2. Inmunofluorescencia *in toto*

Los portaobjetos con las muestras deshidratadas fueron introducidos en una cámara húmeda (placa Petri con papel de filtro mojado y envuelta con papel de aluminio) y rehidratadas mediante dos lavados de 5min cada uno con [PBS1X + NP40 1% (v/v) (Sigma#D6750) + DOC 0,5% (p/v) (Sigma#I3021)] a temperatura ambiente.

El siguiente paso fue añadir a cada pocillo la solución de bloqueo [(BSA 2% (p/v) (Sigma#A7030) + Tween 0,05% (v/v) (Sigma#P1379) en PBS 1X)] durante 30min a temperatura ambiente y a continuación, las muestras fueron incubadas con anticuerpo primario a una concentración de 1:1000 en la misma solución de bloqueo durante toda la noche a 37°C. Después, los pocillos fueron lavados (3 lavados de 5min cada uno) con [PBS1X + NP40 1% (v/v) + DOC 0,5% (p/v)] a temperatura ambiente, se añadió el anticuerpo secundario en solución de bloqueo a una concentración 1:100 y se incubó a 37°C durante 3h.

Tras la incubación, las muestras fueron lavadas de nuevo tres veces (5min/lavado) con [PBS1X + NP40 1% (v/v) + DOC 0,5% (p/v)] y teñidas con DAPI 5X (Thermo#62248) durante 5min a temperatura ambiente. Por último, fueron lavadas sólo con PBS 1X tres veces y dos veces con H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> (5min/lavado).

Las muestras fueron montadas para su observación al microscopio láser confocal (Leica TCS SP5) con una gota del agente *antifading* DABCO (Sigma#290734) por pocillo. Tras la obtención de las imágenes de cada meristemo radicular, fue elegido uno o varios cortes (z) centrales y cuantificada el área determinada por la señal de fluorescencia con el *software* ImageJ 1.49u.

#### 4.3.2.1. Anticuerpos utilizados para la inmunofluorescencia

Los anticuerpos primarios empleados para la detección *in toto* de los distintos marcadores para el estudio del crecimiento celular, fueron:

- Anti-NUC1: anticuerpo policlonal generado en conejo contra la región de reconocimiento de RNA (RRM) de la proteína nucleolina 1 (NUC1, At3G48920), cedido por el Dr. Julio Saéz-Vásquez (Université de Perpignan-Via Domitia, Francia) (Pontvianne et al. 2007).
- Anti-fibrilarina 38F3: anticuerpo monoclonal comercial generado en ratón contra un extracto nuclear de levaduras, que reconoce Nop1p, homólogo de la proteína fibrilarina (FIB, At5G52470) (Abcam#ab4566).
- 

Los anticuerpos secundarios para el revelado de los primarios, fueron:

- Anticuerpo IgG de cabra anti-IgG de conejo conjugado con un fluorocromo verde (Alexa 488nm) para el revelado del anticuerpo primario anti-NUC1.
- Anticuerpo IgG de conejo anti-IgG de ratón conjugado con el fluorocromo verde Alexa 488nm para el revelado del anticuerpo primario anti-FIB.

#### 4.3.3. Tinción de membrana celular con Reinassance

Las muestras para esta tinción fueron preparadas como se ha descrito en el apartado 4.3.1 a excepción del cóctel de digestión de paredes celulares, que en este caso fue: pectinasa 1% (p/v) (Sigma#17389), macerozima 0,5% (p/v) (Serva#28302), manitol 0,4% (p/v) (Sigma#M4125), glicerol 10% (v/v) (Merck#1.04094.1000) y Triton X-100 (Sigma#T9284) 0,2% (v/v).

Una vez, las muestras en los portaobjetos, se añadió a cada pocillo la solución de tinción Reinassance 2% (v/v) (Renchem#SCRI 2200) + DMSO 4% (v/v) (Sigma#D8418) en PBS 1X y se incubó durante 2h a temperatura ambiente y en oscuridad (Musielak et al. 2015).

A continuación, las muestras fueron lavadas tres veces con PBS 1X y dos veces más con H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> (5min/lavado) y después de ser secadas por completo se añadió el medio de montaje *antifading* DABCO (Sigma#290734) para su observación y toma de imágenes en el microscopio láser confocal Leica TCS SP5.



En las imágenes tomadas para cada raíz se seleccionó un corte 'z' central, donde las tres capas de células meristemáticas fueran visibles sin deformación y el *ratio* local de producción celular (*rate of local cell production*), fue calculado con el programa ImageJ 1.49u.

## 5. Técnicas transcriptómicas

### 5.1. Extracción de RNA

Las muestras conservadas a -80°C tras su periodo de crecimiento fueron diseccionadas bajo la lupa (Leica EZ4) en un pocillo de vidrio de 3cm de diametro, situado dentro de una placa Petri más grande con nieve carbónica para evitar la degradación de los ácidos nucleicos en el proceso. Con ayuda de unas tijeras oftalmológicas se separó la parte aérea de la planta y la raíz, descartándose las semillas para que no interfirieran o alteraran los resultados en el caso de no haber germinado.

A continuación, se extrajo el RNA de la parte aérea y la raíz por separado o de la plántula entera, según el experimento, utilizando el kit comercial *RNA isolation from plant*, NucleoSpin (MACHEREY-NAGEL, 740949.250), siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Este kit incluye un tratamiento con DNasa de 15min a temperatura ambiente. Tras la extracción la cantidad y la calidad del RNA extraído fue evaluada en el Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) y los RNAs almacenados a -80°C hasta su utilización.

### 5.2. Análisis de expresión génica por retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

El RNA extraído de la parte aérea de las plantas fue utilizado para estudiar en detalle el proceso de biogénesis de ribosomas por RT-PCR convencional. En concreto, se analizó el procesamiento del transcrito primario 45S en sus regiones no traducidas (secuencias externas transcritas (5'ETS y 3'ETS), en sus secuencias internas transcritas (*Internal Transcribed Spacers*, ITS1 y ITS2) y en el Sitio P) así como en el promotor TIS (*Transcription Initiation Site*) y las cuatro variantes del extremo 3' (denominadas en

conjunto *all var*) (Pontvianne et al. 2010). Los pasos seguidos se desarrollan a continuación.

### 5.2.1. Tratamiento con DNasa

Las muestras utilizadas para este análisis fueron digeridas con un tratamiento extra con DNasa para evitar la contaminación por DNA genómico. Este tratamiento se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante utilizando el kit TURBO™ *DNase Treatment and Removal Reagents* (Ambion#AM1907).

En concreto, se incubaron durante 1h a 37°C, 5µg de RNA (muestra), 5µl de TURBO DNase buffer 10X, 1µl de la enzima TURBO DNase y el volumen necesario de agua libre de nucleasas hasta alcanzar un volumen final de 50µl.

Después, la enzima fue desactivada añadiendo a la mezcla anterior 5µl de resina o *DNase Inactivation Reagent* durante 5min a temperatura ambiente agitando continuamente.

Por último, las muestras se centrifugaron a 12.000rpm durante 2min para separar la resina de la solución acuosa con el RNA y recuperar ésta última y volver a ser medidas en el Nanodrop 2000.

### 5.2.2. Retrotranscripción (RT)

El siguiente paso tras el tratamiento con DNasa es la retrotranscripción del RNA para la obtención del cDNA. Para ello fueron mezclados en un tubo: 500ng de RNA (muestra), 1µl de *Oligo(dT)15 Primer* (Promega#C1101), 1µl de *Random Primers* (Promega #C1181), 1µl de *dNTP Mix* (Promega#U1511) y el volumen necesario de H<sub>2</sub>O libre de RNasas hasta alcanzar un volumen de 13µl. Esta mezcla fue incubada durante 5min a 65°C y puesta inmediatamente en hielo durante al menos 2min para prevenir la hibridación inespecífica de los primers. El proceso entero fue realizado por duplicado para obtener controles sin retrotranscribir (RT-).

A continuación, fueron añadidos a cada uno de los tubos anteriores 7µl de otra mezcla preparada anteriormente con los componentes del kit SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen#18080-093), siguiendo sus indicaciones: 4µl de 5X First-Strand Buffer, 1µl de 0,1M DTT, 1µl de Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor (Promega#N2511) y 1µl de enzima SuperScript™III RT(200U/µl).

El volumen resultante de 20µl fue incubado a 25°C durante 5 min, seguido de otro periodo a 50°C durante 60min y un último periodo a 70°C durante 15min para inactivar la reacción.

El proceso entero fue realizado por duplicado hasta la adición de la segunda muestra (2 tubos/muestra), momento en el cual, a la mitad de los tubos se le añadió esta segunda mezcla con enzima (RT+), como se ha indicado anteriormente, pero a la otra mitad de los tubos se les añadió la misma mezcla sin enzima y en su lugar con H<sub>2</sub>O (RT-).

El cDNA resultante fue almacenado a -20°C hasta su utilización para la amplificación de los genes de interés.

### 5.2.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de las distintas partes del rRNA 45S se realizó utilizando la enzima *GoTaq DNA Polymerase* de Promega (M7845), y con la mezcla de reacción por muestra que se indica en la [Tabla 11](#).

	Volumen
5X Green GoTaq Reaction Buffer	4µl
Forward Primer (10µM)	1µl
Reverse Primer (10µM)	1µl
dNTP Mix (Promega#U1511)	0,5µl
GoTaq G2 DNA Polymerase (5U/µl)	0,2µl
cDNA (muestra/template)	0,75µl
H <sub>2</sub> O libre de RNAsas	12,55µl
Volumen final	20µl

**Tabla 11. Mezcla de reacción de la PCR. Volumen añadido de cada componente en microlitros (µl).**

La PCR se realizó en paralelo en las muestras RT+ y en sus controles RT- y además también se incluyó un control negativo adicional en el que la muestra es H<sub>2</sub>O y un control positivo en el que usamos DNA genómico (2,9 ng/µl), siguiendo el protocolo térmico indicado en la [Tabla 12](#).

Desnaturalización inicial	Número de Ciclos (24-30 según Oligos, ver Tabla 3)			Elongación final
	Desnaturalización	Hibridación	Elongación	
95°C 3min	95°C 30seg	45-62°C 45seg (según Oligos, ver Tabla 13)	72°C 1min	72°C 10min

**Tabla 12. Protocolo térmico de la PCR.** La temperatura (°C) y la duración (minutos o segundos) de cada etapa son mostrados y pueden depender de la pareja de cebadores y las propiedades del amplicón.

Una vez realizada la PCR, el producto amplificado es cargado (5µl) en un gel de agarosa al 2% (p/v) en tampón TAE 0,5X y se desarrolla la electroforesis durante 1h a 130V. El marcador de peso molecular utilizado como patrón fue 1 *Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen#10787-018). Tras la electroforesis, cada gel fue fotografiado en el sistema *Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System120* acoplado a la cámara digital *DC290 Zoom Digital Camera* y su imagen analizada por el programa *ImageJ 1.49u* utilizando como control de carga y normalizador el factor de transcripción *elf1 α* cuya expresión no cambia en las condiciones experimentales.

#### 5.2.3.1. *Primers o cebadores (RT-PCR)*

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados como cebadores para este estudio se muestran en la [tabla 13](#), especificándose su temperatura de hibridación o anillamiento y el número de ciclos de la PCR para cada una de las parejas (Durut et al. 2014; Pontvianne et al. 2010).

Gen	Forward	Reverse	Temperatura hibridación	Número de ciclos
5'ETS (SWU)	5' CGTAACGAAGATGTTCTTGGC 3'	5' ATGCGTCCCTTCCATAAGTC 3'	50°C	24
Sitio P	5' TTGGAACGATTGATGATTTTGAGT 3'	5' TTTCACATGCATGGC 3'	45°C	25
Promotor TIS	5' AGTCTGGGCAGTCCGTGGGG 3'	5' ATGGCAGCCCACGCAAGCAA 3'	62°C	25
3'ETS	5' GTCGCTAAGATTCGAC 3'	5' CCTCGGACCCGGTAAAC 3'	50°C	30
all VAR	5' GACAGACTTGTCAAAACGCCACC 3'	5' CTGGTCGAGGAATCCTGGACGATT 3'	55°C	30
elf1α	5' CTAAGGATGGTCAGACCCG 3'	5' CTCAGGTATGAAGACACC 3'	55°C	30

**Tabla 13. Secuencia de las parejas de cebadores utilizadas para el estudio del procesamiento del pre-rDNA 45S.** La temperatura de hibridación y el número de ciclos de la PCR de cada pareja se muestran en la tabla.

### 5.3. Real-time RT-PCR (RT-PCRq) en un solo paso

El RNA extraído de las raíces de las plántulas, debido a su pequeña cantidad, solo se pudo utilizar para estudiar los niveles de expresión de ciertos genes marcadores de los procesos estudiados mediante RT-PCRq. En concreto, los genes seleccionados como marcadores, fueron: *EIR1* y *TIR1* para el estudio del transporte y recepción de auxinas, *CYCB1;2* y *CK2A;2* para el estudio de la proliferación celular, *FIB1*, *NUC1* y *NUC2* para el estudio del crecimiento celular y las regiones *5'ETS*, *3'ETS* y *25S* para el estudio de la biogénesis de ribosomas.

Esta técnica tiene la ventaja de combinar en un solo paso la reacción de la transcriptasa inversa (RT) y la reacción en cadena de amplificación de la polimerasa (PCR), especialmente en el caso de disponer de poca cantidad de RNA de partida. Se realizó siguiendo las especificaciones del kit comercial *Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QRT-PCR Master Mix* (Agilent Technologies#600886). Este kit posee un agente intercalante fluorescente de DNA (*SYBR Green*), que permite seguir la amplificación en tiempo real durante la reacción y cuantificar el nivel de expresión de dicho gen.

La mezcla de reacción para cada muestra se detalla en la [Tabla 14](#). La PCR se llevó a cabo en el servicio de genómica y proteómica del CIB-CSIC en el termociclador LightCycler 96 System de Roche, siguiendo el protocolo térmico indicado en [Tabla 15](#).

	Volumen
2X SYBR Green QRT-PCR master mix	7,5µl
Forward Primer (5µM)	0,9µl
Reverse Primer (5µM)	0,9µl
DTT (100mM)	0,15µl
RT/RNase block	0,75µl
RNA (4ng/µl) (muestra)	3µl
H <sub>2</sub> O libre de RNAsas	1,8µl
Volumen final	15µl

**Tabla 14. Mezcla de reacción de RT-PCRq. Componentes y cantidades calculadas para cada uno de los componentes de reacción hasta alcanzar un volumen final de 15µl/tubo.** Se prepararon varios *master mix* para muestras que comparten los mismos cebadores para evitar pipetear cantidades tan pequeñas.

Reaccion Transcriptasa inversa	Activación polimerasa	Ciclos 40X			Elongación final
		Desnaturalización	Hibridación	Elongación	
48°C 30min	95°C 10min	95°C 10seg	60°C 20seg	72°C 30seg	72°C 10min

Tabla 15. Protocolo térmico RT-PCRq. Duración (minutos o segundos) y temperatura (°C) de cada etapa.

Una vez realizada la RT-PCR, los valores de Ct dados por el programa del termociclador fueron exportados a una hoja de cálculo Excel y fue calculada la expresión relativa de cada gen siguiendo el protocolo descrito por Livak *et al* (Livak y Schmittgen 2001) de la siguiente manera:

$$1. \text{ Cálculo de } \Delta Ct: \Delta Ct_{\text{muestra}} = Ct_{\text{gen estudiado}} - Ct_{\text{gen normalizador}}$$

$$\Delta Ct_{\text{calibrador}} = Ct_{\text{calibrador}} - Ct_{\text{gen normalizador}}$$

$$2. \text{ Cálculo de } \Delta \Delta Ct: \Delta \Delta Ct = \Delta Ct_{\text{muestra}} - \Delta Ct_{\text{calibrador}}$$

$$3. \text{ Cálculo Fold Change: Fold Change} = 2^{-\Delta \Delta Ct}$$

$$4. \text{ Expresión relativa: } 2^{-\Delta \Delta Ct_{\text{condición experimental}}} / 2^{-\Delta \Delta Ct_{\text{condición control}}}$$

El gen normalizador debe ser un gen cuya expresión no varía en ninguna de las condiciones experimentales. En nuestro caso el gen normalizador utilizado fue el gen de la actina 2 (*ACTIN2*, At3G18780.1).

El calibrador es un *pool* de muestras de RNA similares a las del estudio, y que deber ser siempre incluido y ser el mismo, en todas las carreras o placas de PCR que se desee comparar. Este calibrador permite comparar la expresión genética de muestras realizadas en distintas placas por varios motivos, normalmente por falta de espacio. En nuestro caso se utilizó como calibrador una mezcla de RNA extraído de las raíces de los distintos genotipos estudiados según su base genética *Landsberg erecta* (Ler) o *Columbia* (Col-0).

### 5.3.1. *Primers* o cebadores (RT-PCRq)

Las parejas de cebadores utilizadas para el estudio de los diversos procesos por RT-PCRq fueron diseñadas utilizando el programa de libre acceso en Internet, *Primer 3 Plus*. Previamente a su utilización para la cuantificación de niveles de expresión de las muestras, su eficacia fue comprobada por la realización, para cada pareja de *primers*, de una curva estándar o patrón con 6 diluciones seriadas de factor 1/3 partiendo de una concentración de 100ng/μl. Esta curva patrón nos permitió elegir aquellas parejas con una buena eficacia ( $E=2 \pm 0.05$ ) y un único producto de amplificación (un único pico en

la curva de *melting*) además, de concentración óptima de la muestra, en nuestro caso 4ng/μl.

Las secuencias de las distintas parejas de cebadores aparecen en la [Tabla 16](#).

Gen	Forward	Reverse
<b>EIR1 (PIN2)</b>	5' GCAATGTTTAACGCAAGCAA 3'	5'GCCTCCTCTTCCTGCTTTCT 3'
<b>TIR1</b>	5' ATTTTGGGATGCTGTTCCCTG 3'	5' GAAGCAAGCACCTCAAGACC 3'
<b>CK2A;2</b>	5' ACCAGGATCAGCTCGTCAAA 3'	5' CTTTCTGCTGCCCTGACTTG 3'
<b>CYCB1;2</b>	5' GTGCCTTGCTTATTGCTTCC 3'	5' ATTGCCTTCATCACCAG 3'
<b>NUC1</b>	5' CCGAGAGGAGATAGCAGTGG 3'	5' TCCACGACCACGATCACTT 3'
<b>NUC2</b>	5' CCAAGAGATAGTGATGAGGG 3'	5' CATTACACTTGGTTTGCTGG 3'
<b>FIB1</b>	5' CGTCTTTCGTTCTTCACTTTTAGACAAG 3'	5' GCCCACTACGGCCTCTGTCA 3'
<b>5'ETS</b>	5' TTGGAACGATTGATGATTTTGAGT 3'	5' GCCTACGAACACTAGCTATCCGA 3'
<b>3'ETS</b>	5' GAATTCCCAACTTTACACGAGCTC 3'	5' AAGTAATAACATTTAACCTCGAGAGACGAG 3'
<b>25S</b>	5'TGTTACCCACCAATAGGGAA 3'	5' TCAGTAGGGTAAACTAACCTGTCTCAC 3'
<b>ACTIN-2</b>	5'GCACCCTGTTCTTCTTACCG 3'	5'ATCCAGCACAATACCGGTTGTA 3'

Tabla 16. Secuencia de las parejas de cebadores utilizados en RT-PCRq.

## 5.4. Análisis de expresión génica a nivel de genoma completo por secuenciación masiva (RNAseq)

RNA extraído de plántulas completas (apartado 5.1) fue medido en el *Bioanalyzer 2100 expert\_Plant\_RNA nano* para determinar su concentración y garantizar su calidad o integridad utilizando para ello 1μl de cada muestra, como indica *Agilent RNA 6000 Nano Kit* (Agilent Technologies#5067-1511). Una vez comprobado que la calidad del RNA era suficiente (*RNA Integrity Number*, RIN>7), se preparó una placa de 96 pocillos con el volumen necesario de cada muestra correspondiente a 1μg de RNA y se envió a la empresa de secuenciación FASTERIS (Suiza) que realizó una secuenciación *HiSeq 3000/4000 Illumina (High Output Version 4*, de 24 muestras multiplexadas en dos líneas con 1x50+8+8 ciclos y una cobertura Q30 estimada del 85%). El rendimiento de secuenciación real fue de 36,2 Gigabases (de 614-925 Mb x 2 líneas para cada muestra). El número de réplicas para las muestras expuestas a luz roja (tanto microgravedad como control 1g) fue de 3 réplicas biológicas. En el caso de las muestras en oscuridad los últimos dos días del experimento espacial solo se pudieron obtener dos réplicas.

La *pipeline* de procesamiento de datos inicial de FASTERIS incluyó *HiSeq Control Software 3.3.52*, *RTA 2.7.3* y *bcl2fastq2.17*. Una vez recibidos los datos de secuenciación brutos, para cada librería se realizó un control de calidad con Fastqc, para posteriormente eliminar o filtrar la lecturas correspondientes al ARN cloroplástico, mitocondrial y ribosómico con la herramienta Bowtie2 (*fast gapped-read alignment*)(Langmead y Salzberg 2012). A continuación, las lecturas fueron mapeadas frente a la base de datos TAIR10 (Genoma de *Arabidopsis thaliana*) utilizando el archivo de anotación gtf y los parámetros por defecto de HISAT (*fast spliced aligner*) (Kim et al. 2015). El ensamblaje de cada transcrito y su cuantificación (número de lecturas) se llevó a cabo mediante el análisis diferencial del programa *Cufflinks* y aplicando una corrección de falsos positivos o *false discovery rate* (FDR) del 5% (Trapnell et al. 2010). Finalmente fueron filtrados aquellos transcritos que no tenían al menos 1rpkm (*reads per kilobase per million mapped reads*) en una de las condiciones (control o experimental).

Los datos transcriptómicos obtenidos se analizaron con varias aplicaciones:

- Para obtener una primera impresión visual de los cambios a nivel global se utilizó el programa GEDI (Gene Expression Dynamic Inspector v.2.1; Eichler et al., 2003), que realiza un análisis de *clustering* (de tipo *Self Organizing Map*) para un listado de genes en función del número de lecturas o de su expresión diferencial (*ratio* en base 2 del número de lecturas frente al control) en todas las muestras secuenciadas, y nos devuelve una imagen para cada condición experimental con todos estos grupos de genes coloreados en una escala del rojo (sobrerepresentados en esa condición) al azul (infrarepresentados) ordenados espacialmente más cerca de los genes que varían de forma similar a lo largo de las condiciones experimentales. Los diferentes filtros que utilizamos (cambios significativos en una o más comparaciones y la inclusión de la corrección FDR<5%) se indican en cada caso en la sección de resultados.
- Para obtener una comparación funcional, basada en los grupos ontológicos (COG) como aparecen en la versión 10 TAIR del genoma de *Arabidopsis* (TAIR, <https://www.arabidopsis.org/>), se cuantificó el número de genes con diferencias



de expresión en cada condición experimental y en las intersecciones entre ellas (diagrams de Venn) y en cada lista (separando sobreexpresados y reprimidos) se verificó el número relativo de genes con cambio significativo de expresión para cada categoría COG.

- Alternativamente, se utilizó la herramienta BINGO 2.3 (Maere et al., 2005) que permitió detectar que grupos ontogénicos están sobrerrepresentados en una lista de genes obtenida previamente bien si ha sido extraída directamente de un cluster o área de interés en la herramienta GEDI o se basa en el filtrado de diferencias significativas de expresión ( $p < 0,05$ ) con otras herramientas.

## **6. Análisis Estadístico**

Los datos fueron analizados con el programa estadístico SPSS (IBM SPSS Statistics v22.0). En primer lugar comprobamos que la distribución de la poblaciones era normal con el análisis de Shapiro-Wilk (SW), en caso de que el tamaño muestral ( $n$ ) fuera menor de 20 y con el análisis de Kolmogorov-Smirnov (KS), en caso de que ese tamaño muestral fuera mayor a 20. Las poblaciones con distribución normal fueron sometidas al Test de Levene para comprobar su homocedasticidad o igualdad de varianzas.

A continuación, en función de los resultados obtenidos de estos test estadísticos y si se compararon dos poblaciones o más se procedió de la siguiente manera:

### **1. Comparación de dos grupos o poblaciones independientes:**

Las poblaciones con distribución normal y homocedásticas fueron comparadas con el Test t-Student bilateral, pero si las poblaciones tenían una distribución normal pero no eran homocedásticas se aplicó este mismo test con la corrección de Welch, que asume no igualdad de varianzas.

Las medias de las poblaciones que no mostraron una distribución normal fueron comparadas con el Test U de Mann-Whitney- Wilcoxon (prueba no paramétrica).

2. Comparación de tres o más grupos independientes:

Las poblaciones con distribución normal y homocedásticas fueron comparadas en primer lugar con el test ANOVA para saber si existía alguna diferencia entre los grupos y en segundo lugar se utilizó el Test de Scheffe (poblaciones con distinto tamaño, n) para conocer de forma específica que grupos poseen diferencias significativas entre ellos.

Las poblaciones no normales fueron comparadas con la prueba no paramétrica Test U de Mann-Whitney-Wilcoxon con la correspondiente corrección de Bonferroni del nivel de confianza.

Todos los test o prueba mencionadas fueron realizadas con una nivel de confianza del 95% ( $\alpha=0,05$ ) a excepción de la última.



# RESULTADOS

## “Seedling Growth”

- 1. SEEDLING GROWTH 1-2: Análisis transcripcional (qRT-PCR) de los efectos del ambiente espacial (microgravedad real y gravedad parcial) y su recuperación por luz roja en el desarrollo temprano de *Arabidopsis* (colección fitocromos)**
- 2. SEEDLING GROWTH 2: Análisis transcripcional (RNAseq) de los efectos del ambiente espacial (microgravedad real) y su recuperación por luz roja en el desarrollo temprano de *Arabidopsis* (colección nucleolinas)**
- 3. SEEDLING GROWTH 3: Estudios de proliferación y crecimiento celular en el meristemo radicular de plántulas de *Arabidopsis thaliana* en ambiente espacial (microgravedad real y gravedad parcial) y su recuperación por luz roja (colección nucleolinas)**

## Resultados

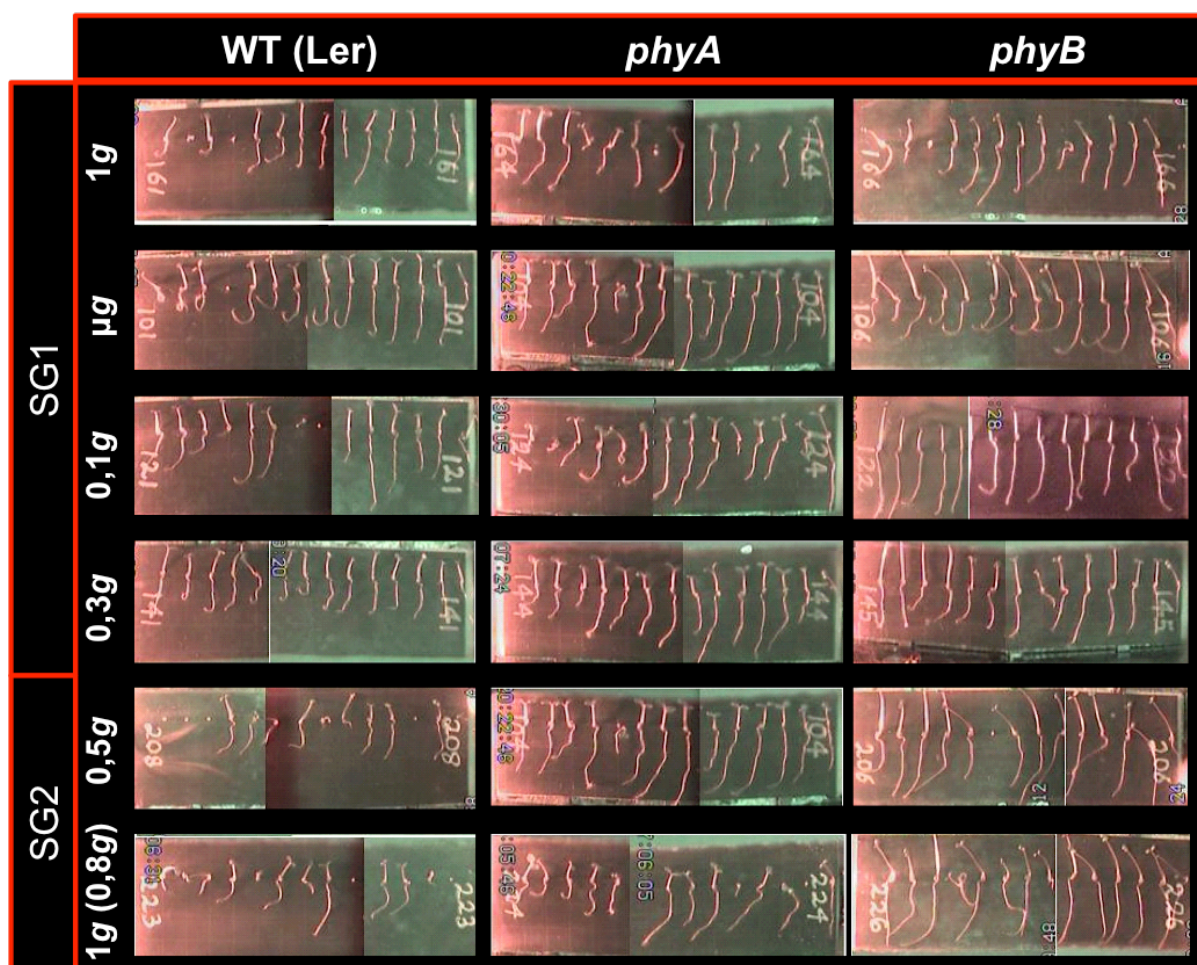
### **1. SEEDLING GROWTH 1-2: Análisis transcripcional (qRT-PCR) de los efectos del ambiente espacial (microgravedad real y gravedad parcial) y su recuperación por luz roja en el desarrollo temprano de *Arabidopsis* (colección fitocromos)**

En el experimento espacial “Seedling Growth” semillas de *Arabidopsis thaliana* silvestres ecotipo *Landsberg erecta* y de dos líneas de mutantes de fitocromos, *phyA-201* y *phyB-1*, germinaron y crecieron en la Estación Espacial Internacional (ISS), durante los primeros 4 días con luz blanca continua y gravedad terrestre (1g), simulada por la centrífuga del *European Modular Cultivation System* (EMCS). Los dos últimos días de crecimiento fueron iluminadas con luz roja unilateral constante y sometidas a distintos niveles de gravedad. En concreto, durante “Seedling Growth 1” los niveles de gravedad fueron:  $\mu g$  real, 0,1g, 0,3g y 1g (control en vuelo) y durante “Seedling Growth 2” fueron 0,5g y 1g (control en vuelo).

Durante el periodo de crecimiento (6 días) se tomaron imágenes de éstas plántulas para analizar parámetros morfométricos (longitud de la raíz) y tras el periodo de crecimiento fueron congeladas a -80°C en el congelador denominado MELFI ubicado en la ISS para su análisis transcriptómico.

#### **1.1. Estudio morfométrico de la raíz**

La longitud de la raíz primaria se ha medido en las imágenes tomadas el último día del periodo de crecimiento de las plántulas (6 días) para conocer el efecto conjunto de la fotoestimulación con luz roja unilateral y distintos niveles de gravedad ([FIGURA 50](#)).



**Figura 50. Imágenes de plántulas de 6 días tomadas durante los experimentos SG1 y SG2 realizados en la Estación Espacial Internacional.** Un *cassette* por condición experimental (nivel de gravedad en los dos últimos días de crecimiento) es mostrado para cada uno de los tres genotipos estudiados (WT-Ler, *phyA* y *phyB*). Todas las muestras crecieron durante los cuatro primeros días con luz blanca continua proporcionada por LEDs situados en la parte superior del *cassette* y durante los dos últimos de crecimiento con luz roja continua proporcionada por LEDs situados en la parte lateral del *cassette*.

Este parámetro mostró un aumento en todas las muestras crecidas en microgravedad real en comparación con el control en vuelo (1g), siendo estadísticamente significativo en los tres genotipos estudiados (FIGURA 51A). La longitud de la raíz aumentó de forma general en todas las condiciones de gravedad parcial, pero la intensidad de este efecto es menor a medida que aumenta el nivel de gravedad, siendo este aumento significativo a 0,1g en el genotipo silvestre (Ler) y el mutante *phyB* (FIGURA 51B), permaneciendo a 0,3g solo en WT-Ler (FIGURA 51C), y apareciendo como una tendencia a 0,5g independientemente de la línea de *Arabidopsis thaliana* estudiada (FIGURA 51D).

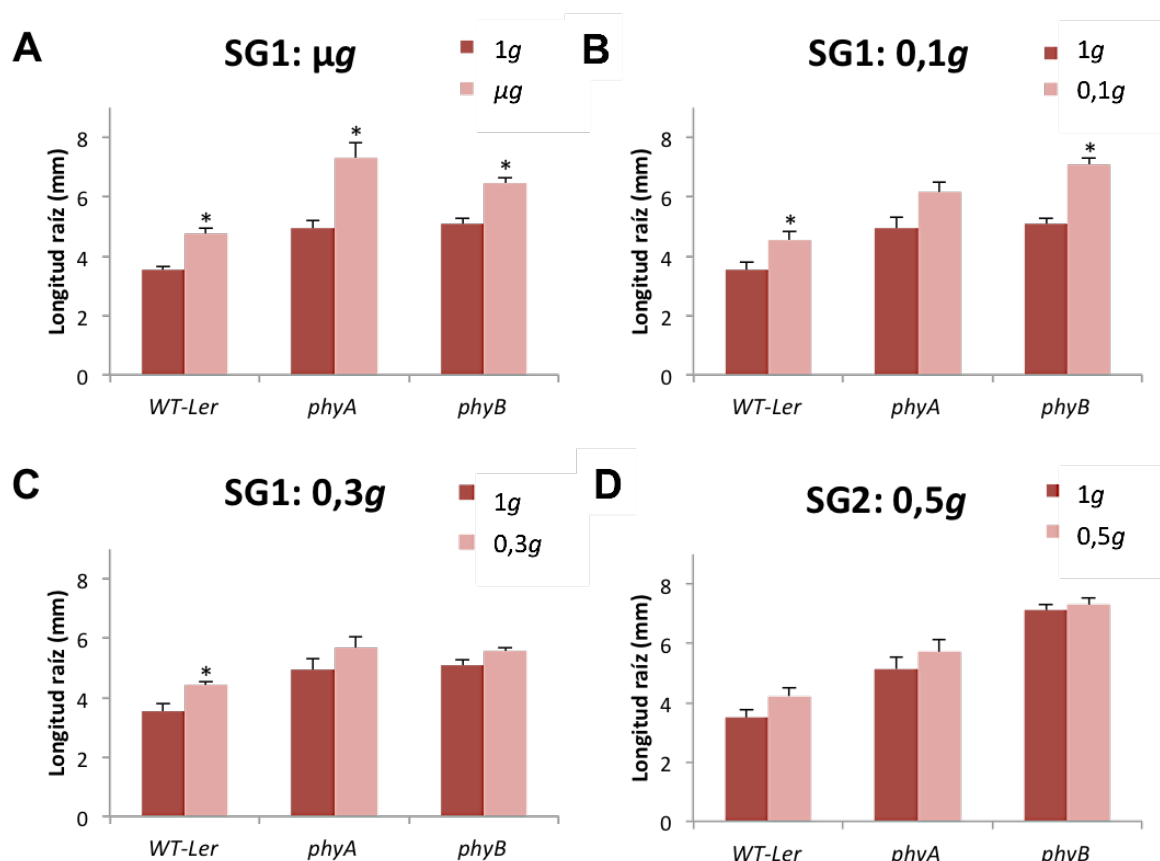


Figura 51. Longitud de la raíz primaria de plántulas crecidas en la ISS (experimentos SG1 y SG2) en microgravedad real (A), 0,1g (B), 0,3g (C) y 0,5g (D) junto con el correspondiente control en vuelo (1g) para cada uno de los tres genotipos estudiados (WT-Ler, *phyA* y *phyB*).

\* Diferencias significativas respecto al control en vuelo 1g ( $p < 0,05$  Test T-Student)

## 1.2. Análisis transcripcional (qRT-PCR)

Al finalizar el periodo de crecimiento de 6 días, las plántulas crecidas en los experimentos SG1 y SG2 fueron congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  en el congelador MELFI de la ISS y retornadas a la Tierra en el congelador GLACIER de la capsula “Dragon” para posteriormente ser introducidas en *RNAlater* para su estabilización y transporte a Madrid, siempre sin romper la cadena de frío. Una vez en el laboratorio, las plántulas fueron diseccionadas en parte aérea y raíz para la extracción de su RNA por separado. El RNA procedente de las raíces fue utilizado para estudiar diferencias en la expresión de tres conjuntos de genes, seleccionados como marcadores de diferentes procesos celulares, por qRT-PCR. El primer conjunto de genes está formado por dos genes implicados en la percepción y transporte polar de auxinas (*TIR* y *EIR*), el segundo conjunto está formado por genes implicados en la regulación del ciclo celular (*CYB1;2* y *CDK2A;2*), utilizados como indicadores de proliferación celular y el tercer grupo está

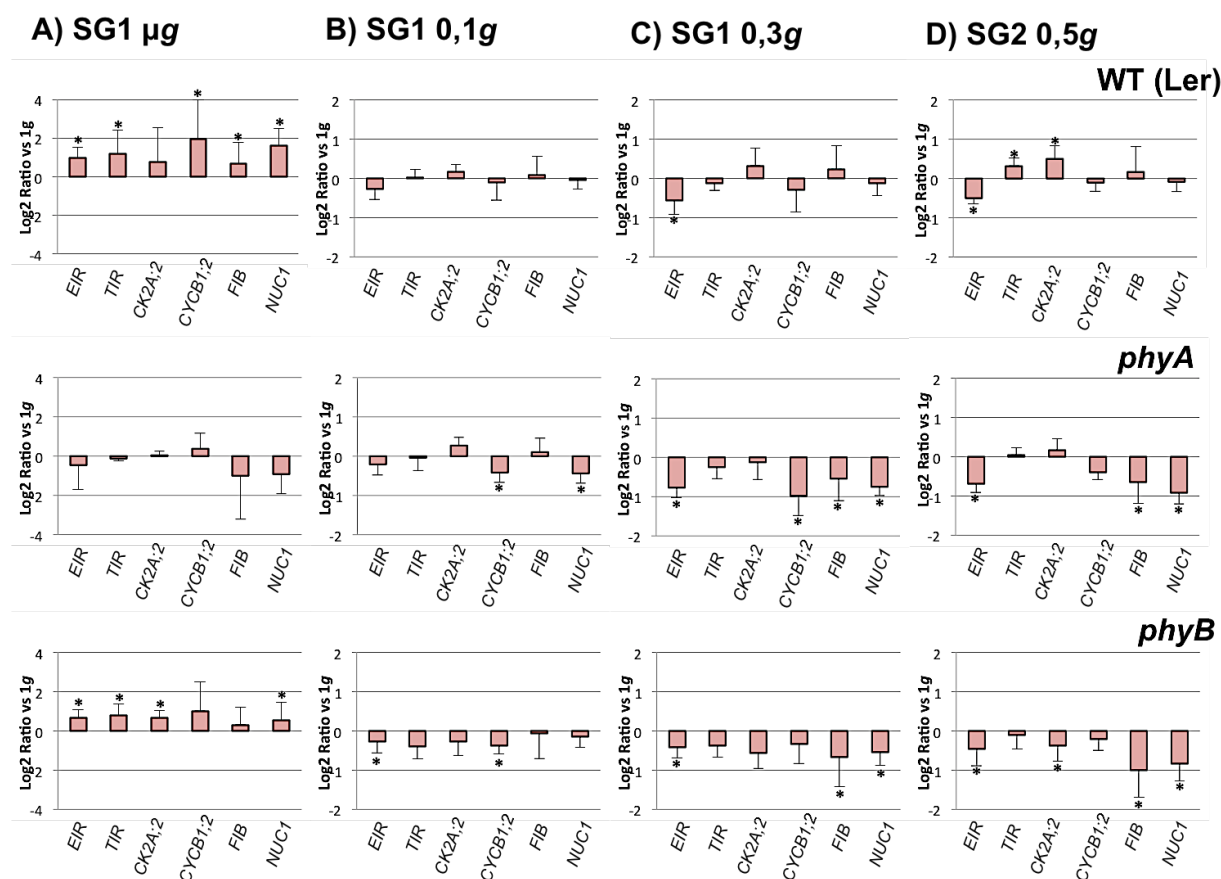
formado por genes implicados en la regulación de la biogénesis de los ribosomas (*NUC1* y *FIB*), que sirven como indicadores de crecimiento celular.

Con carácter general, el patrón de expresión obtenido en la condición de microgravedad real ( $\mu g$ ) es diferente al patrón de expresión de los niveles parciales de gravedad (0,1g, 0,3g y 0,5g). En microgravedad real, todos los genes marcadores presentaron un aumento de expresión, en las líneas WT-Ler y *phyB*, respecto del control 1g. Los marcadores de auxinas, de ciclo celular y crecimiento celular mostraron un aumento de expresión en microgravedad real, siendo especialmente intenso para el gen de la *CYCB1;2* en el WT-Ler. En cambio, el mutante *phyA* no mostró variaciones significativas de expresión en ninguno de los genes marcadores analizados, aunque se puede observar una suave disminución de expresión de los genes marcadores de crecimiento celular (FIGURA 52A).

En condiciones de gravedad parcial, el genotipo silvestre (WT-Ler) mostró alteraciones muy pequeñas y no significativas en los genes marcadores de crecimiento y proliferación celular, excepto en los genes marcadores del transporte de auxinas. En cambio, ambas líneas mutantes de fitocromos (*phyA* y *phyB*) mostraron un patrón similar de expresión, con al menos uno de los genes marcadores para cada grupo con expresión reducida respecto del control en vuelo 1g. Además, estas diferencias son proporcionales al nivel de gravedad aplicado, siendo las variaciones muy pequeñas a 0,1g (algunas son estadísticamente significativas) y haciéndose más consistentes y cuantitativamente mucho más evidentes a 0,3g y 0,5g.

Se puede observar claramente una disminución en la expresión de ambos marcadores de crecimiento celular en las dos líneas mutantes y no en el WT-Ler, y del gen *EIR* (*PIN2*) en las tres líneas (FIGURA 52B, C y D).





**Figura 52. Expresión relativa estimada por qRT-PCR en plántulas (raíz) de los experimentos SG1 y SG2 a los distintos niveles de gravedad aplicados.** Tres grupos de genes han sido utilizados como marcadores de los principales procesos celulares del meristemo radicular: transporte y percepción de auxinas (*EIR* y *TIR*), proliferación celular (*CK2A;2* y *CYCB1;2*) y crecimiento celular (*NUC1* y *FIB*). Los histogramas indican diferencias de expresión (Log2Ratio) entre las muestras crecidas a microgravedad real (A), 0,1g (B), 0,3g (C) y 0,5g (D) en comparación con el control en vuelo (1g).

\* Diferencias significativas respecto al control en vuelo 1g (p<0,05 Test T-Student)

## 2. SEEDLING GROWTH 2: Análisis transcripcional (RNAseq) de los efectos del ambiente espacial (microgravedad real) y su recuperación por luz roja en el desarrollo temprano de *Arabidopsis* (colección nucleolinas)

En la segunda fase del experimento espacial "Seedling Growth 2" distintas líneas de plantas de *Arabidopsis thaliana* (WT-Col-0, *aux1.7*, *eir1.1*, *tir1*, *nuc1* y *nuc2*) germinaron y crecieron durante 6 días a nivel constante de gravedad, microgravedad real (µg) o 1g (control en vuelo obtenido mediante la centrífuga instalada en el EMCS). En cambio, el

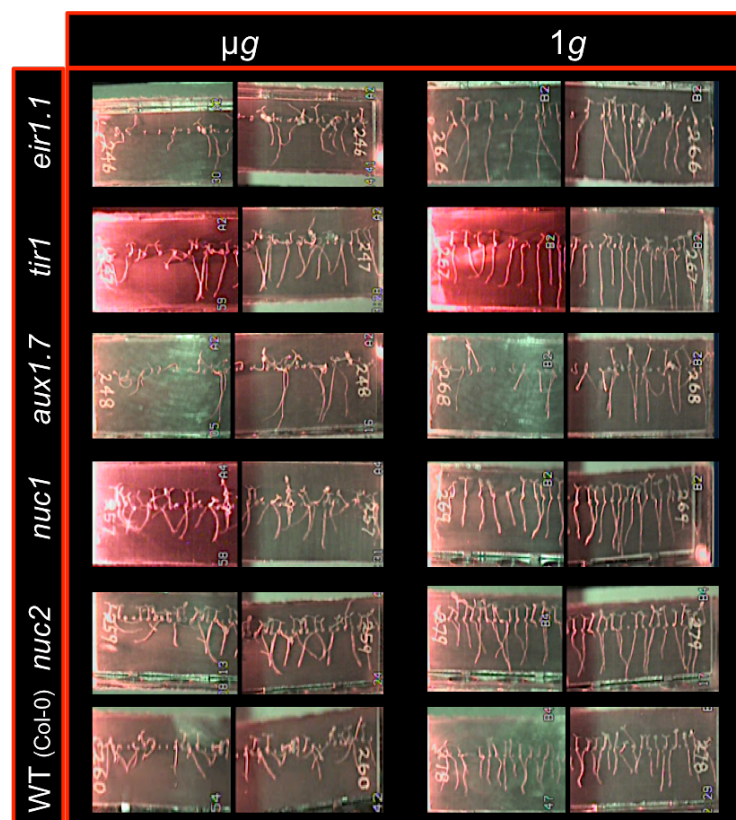
régimen de iluminación los primeros cuatro días de crecimiento fue fotoperiodo (16h luz blanca/8h oscuridad) y durante los dos últimos días fue oscuridad o luz roja unidireccional.

En este experimento se produjo, desgraciadamente, un fallo en la hidratación de uno de los contenedores experimentales (EC), concretamente el que contenía semillas del tipo WT-Col-0 destinadas a crecer en gravedad 1g y a permanecer en oscuridad durante los últimos dos días. Consiguientemente, no se produjeron plántulas crecidas en estas condiciones.

Durante el periodo de crecimiento se tomaron imágenes a distintos tiempos para seguir la germinación y el crecimiento y transcurridos los 6 días las plántulas fueron congeladas a -80°C y transportadas de igual forma que en SG1.

## 2.1. Estudio morfométrico de la raíz

La longitud de la raíz primaria ha sido medida en las imágenes adquiridas al finalizar el periodo de crecimiento (6 días) correspondientes a plántulas los genotipos WT (Col-0), *nuc1* y *nuc2*, crecidas en todas las condiciones de gravedad y luz, excepto, obviamente, las contenidas en el EC que no se hidrató (WT-Col-0, 1g, no fotoactivación) (FIGURA 53).

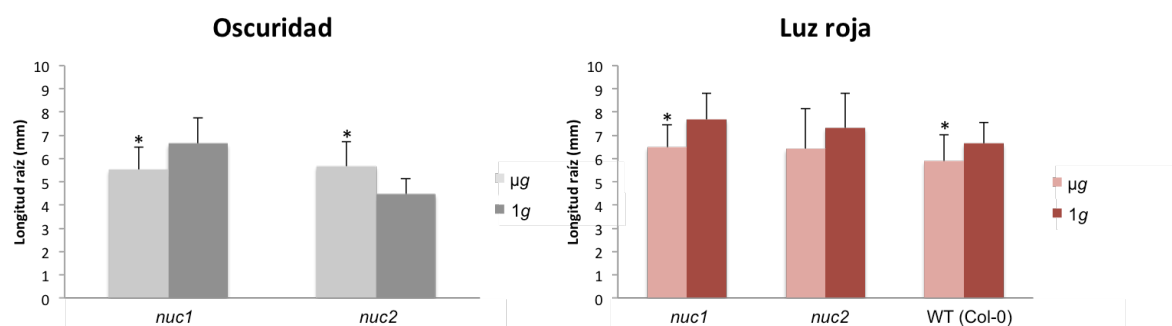


**Figura 53. Imágenes tomadas al fin del periodo de crecimiento (6 días) de las plántulas de *Arabidopsis thaliana* crecidas durante la segunda fase del experimento SG2 desarrollado en la ISS.** En la figura se muestra un cassette correspondiente a cada uno de los genotipos utilizados (WT-Col-0, *aux1.7*, *eir1.1*, *tir1*, *nuc1* y *nuc2*) y condición de gravedad ( $\mu g$  y 1g) e iluminados durante los dos últimos días del periodo de crecimiento con luz roja unidireccional.

## Resultados

La longitud de la raíz de las plántulas crecidas los dos últimos días en oscuridad fue significativamente menor en la línea *nuc1* y mayor en la línea *nuc2*, en comparación con el correspondiente control en vuelo *1g* (FIGURA 54).

En condiciones con iluminación con luz roja unidireccional durante los dos últimos días, este parámetro mostró el mismo comportamiento que en oscuridad para el mutante *nuc1* y la línea mutante *nuc2* no mostró ninguna variación significativa, aunque siguió la misma tendencia. Además, en esta última condición, la longitud de la raíz primaria del genotipo WT-Col-0 también fue menor respecto a su control *1g* (FIGURA 54).



**Figura 54. Longitud de la raíz de plántulas crecidas en la ISS durante la segunda fase del experimento SG2.** Las gráficas muestran la longitud de la raíz primaria de las líneas de colección de nucleolinas (WT-Col-0, *nuc1* y *nuc2*) para los dos regímenes de iluminación durante los dos últimos días de crecimiento, a excepción de la línea silvestre en oscuridad al no disponer de estas muestras por un fallo en la hidratación de los *cassettes*.

\* Diferencias significativas respecto al control en vuelo *1g* ( $p < 0,05$  Test T-Student)

## 2.2. Análisis transcripcional (RNAseq)

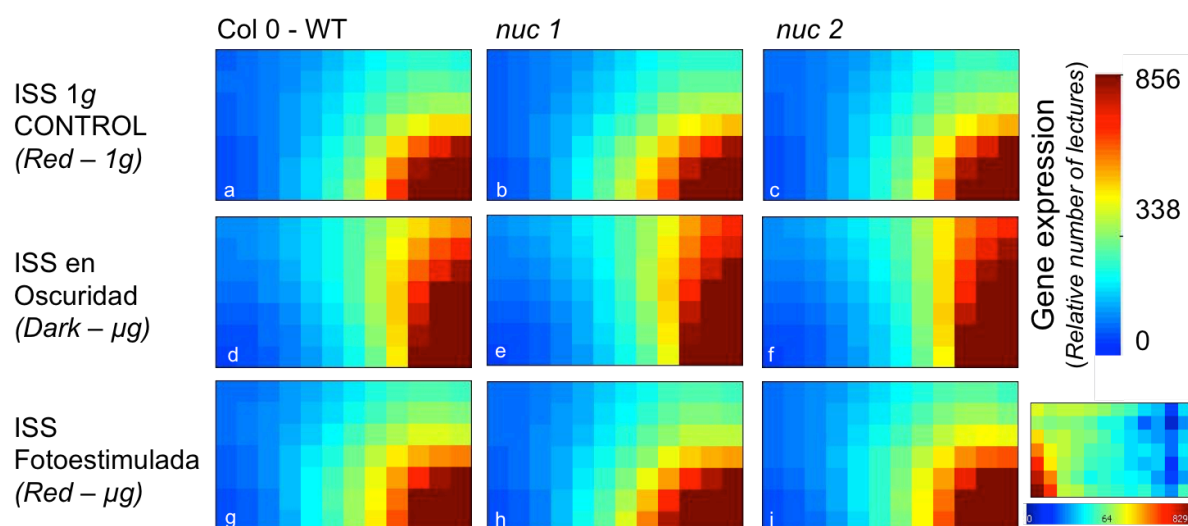
Plántulas completas de las líneas silvestre (WT-Col-0) y mutantes de nucleolina (*nuc1* y *nuc2*) fueron utilizadas para realizar un análisis de secuenciación masiva tipo RNAseq para determinar el patrón de expresión a nivel de transcriptoma completo en las tres condiciones ambientales disponibles (oscuridad-microgravedad real, luz roja-microgravedad real y luz roja-control *1g*) y en estos tres genotipos. Debido a la pérdida de las muestras Col 0-WT en la condición control (*1g*) de oscuridad, la condición luz roja-*1g* se ha considerado la condición estándar de referencia, por ser la más favorable para el crecimiento óptimo de las plantas, al no existir ni estrés gravitacional ni lumínico. La condición oscuridad- $\mu g$  es la condición experimental que nos permite detectar los efectos de la microgravedad real en ausencia de cualquier estímulo

tropístico que oriente el crecimiento de la planta. Por último, la condición experimental luz roja- $\mu g$  nos permite evaluar si la fotoestimulación con luz roja es capaz de compensar o contrarrestar los efectos del estrés gravitacional producido por la microgravedad.

### 2.2.1. Análisis transcriptómico global: GEDI

Una vez obtenidas las listas de genes identificados en cada secuenciación y su abundancia relativa, se utilizaron estos listados de genes en la herramienta de visualización GEDI que analiza simultáneamente todos los genes localizados en las muestras y los clasifica en grupos con expresión similar en las condiciones estudiadas (clusters). Después coloca en una matriz esos clusters de forma que los más similares están más próximos. Por último, esa matriz se utiliza para generar un panel para cada condición experimental en la que se representa en color azul (infrarrepresentación) o rojo (sobrerrepresentación) el promedio de expresión de ese cluster de genes, generando una imagen del estado transcripcional del genoma para cada una de las condiciones estudiadas.

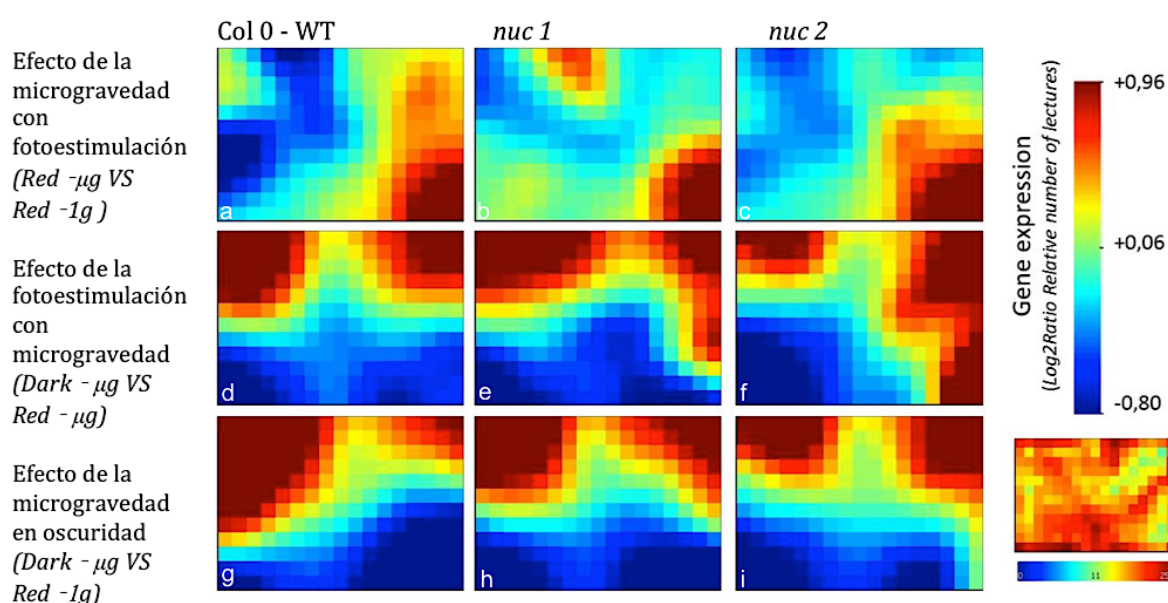
En la [Figura 55](#) se muestra un primer análisis de los datos representando todos los genes secuenciados, sin filtrar ni considerar la relevancia estadística de las comparaciones. En esta primera aproximación se observa en la primera columna que el patrón global en Col 0-WT mostró diferencias entre las condiciones consideradas control (luz roja y 1g; panel a) y las condiciones experimentales que dan cuenta del efecto espacial sin interferencia lumínica ( $\mu g$  en oscuridad/sin fotoactivación; panel d). Cuando, sobre estas condiciones, se realizó la fotoactivación con luz roja (panel g), el patrón global de expresión reversionó al patrón control. El resultado fue prácticamente idéntico en los dos mutantes de nucleolina utilizados.



**Figura 55. Análisis global (GED) de la secuenciación de transcriptoma completo del experimento SG2 (22719 genes secuenciados al menos una vez en alguna de las muestras experimentales).** Se muestra un panel para cada condición experimental de los dos últimos días de crecimiento en la ISS (fotoestimulación con luz roja y gravedad  $1g$  en la primera fila, microgravedad en oscuridad en la segunda fila y microgravedad con fotoestimulación en la tercera fila) para cada genotipo (Col 0-WT en la primera columna, *nuc1* en la segunda y *nuc2* en la tercera). Se muestran a la derecha la escala de expresión (en número relativo de lecturas de RNAseq) promedio en cada pixel/cluster así como la distribución de genes en cada cluster (panel inferior). A nivel de genoma completo el efecto fotoestimulador de la luz roja es capaz de eliminar las alteraciones que provoca la microgravedad, sin detectarse variaciones importantes entre genotipos.

A continuación, realizamos las comparaciones de expresión ( $\log_2$  ratio del número de lecturas) y filtramos los datos (con un análisis para eliminar los falsos positivos, FDR  $p < 0,05$ ) para estudiar únicamente los genes que mostraban variaciones de expresión estadísticamente significativas entre las condiciones experimentales o entre los genotipos estudiados. El número de genes cuyo número de lecturas RNAseq cambia significativamente, aunque sean variaciones cuantitativamente pequeñas, en al menos una comparación es de 14546, reduciéndose a 12151 si requerimos que la variación se produzca al menos en 2 comparaciones. En la [figura 56](#) mostramos las comparaciones entre condiciones experimentales dentro de cada genotipo utilizando los 14546 genes (el resultado global es muy similar filtrando por 2 comparaciones pero la distribución de clusters es menos homogénea en ese caso). Las muestras expuestas a microgravedad en oscuridad muestran un cambio de expresión muy similar si lo comparamos con muestras fotoestimuladas (paneles d, e, f frente a g, h, i), soportando la hipótesis de que la luz roja es capaz de eliminar la mayor parte de las alteraciones inducidas por la microgravedad. Concretamente, aquí se puede observar que existen unos efectos de la microgravedad más débiles comparando las muestras en gravedad  $1g$  y microgravedad con el mismo régimen de iluminación (paneles a, b y c).

Aparecen algunas diferencias entre genotipos, con regiones con expresión opuesta en *nuc1* en comparación con WT o *nuc2* (zona superior izquierda de paneles a, b, y c). Seleccionando los genes incluidos en los clusters de este área se observa un enriquecimiento en genes relacionados con la respuesta a luz/radiación, fotosíntesis y cloroplastos (ver Tabla 17, columna 1). También es destacable en la esquina inferior derecha una zona sobreexpresada en todos los mutantes en la primera fila (paneles b y c) pero solo en *nuc2* en la segunda fila (panel f). Aquí se observa un enriquecimiento significativo en genes de respuesta a estrés, particularmente el hídrico y térmico (ver Tabla 17, columna 2).



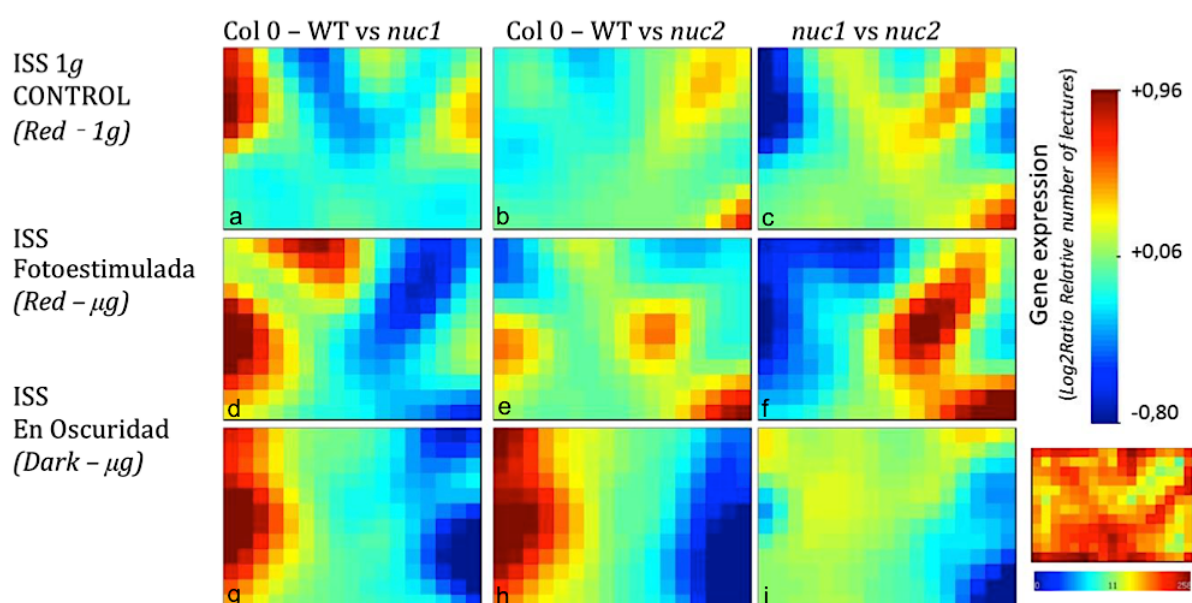
**Figura 56. Análisis global (GEDI) de la secuenciación de transcriptoma completo del experimento SG2 (14546 genes con diferencias de expresión significativas en al menos una de las muestras experimentales).** Se muestra un panel para cada comparación entre condiciones experimentales los dos últimos días de crecimiento en la ISS (filas) y para cada genotipo (Col 0-WT en la primera columna, *nuc1* en la segunda y *nuc2* en la tercera). Se muestran a la derecha la escala de expresión (como logaritmo en base 2 del ratio entre el número relativo de lecturas de RNAseq) promedio en cada pixel/cluster así como la distribución de genes en cada cluster (panel inferior). Se confirma que el efecto fotoestimulador de la luz roja es capaz de eliminar la mayoría de las alteraciones que provoca la microgravedad.

En la Figura 57 se ha empleado el mismo análisis GEDI pero realizando las comparaciones entre genotipos manteniendo constante la variable medioambiental. De esta forma se puede observar la diferencia entre las respuestas transcripcionales globales de cada genotipo. Aunque la interpretación biológica de cada panel es compleja, resultan útiles las comparaciones entre ellos, por ejemplo, en la tercera fila (microgravedad en oscuridad), los dos mutantes *nuc1* y *nuc2* se comportan prácticamente igual (panel i), sin embargo hay muchos genes sobreexpresados o reprimidos en el WT



## Resultados

en esas condiciones (paneles g y h). En cambio, en condiciones 1g control con fotoestimulación roja (primera fila) se observan muy pocos cambios entre WT y *nuc2* (panel b), siendo el genotipo *nuc1* el que presenta mayores diferencias (panel a). En el caso de fotoestimulación en microgravedad observamos un efecto incluso más complejo, una vez más siendo *nuc1* el genotipo más variable (panel d). Concretamente cabe destacar un grupo de genes en la esquina superior izquierda (sobreexpresados en el panel a y reprimidos en el panel c) que está enriquecidos en genes de maduración de la raíz y estrés oxidativo (Tabla 17, columna 3).



**Figura 57. Análisis global (GEDI) de la secuenciación de transcriptoma completo del experimento SG2 (14546 genes con diferencias de expresión significativas en al menos una de las muestras experimentales).** Se muestra un panel para cada comparación entre genotipos (columnas) manteniendo constantes las condiciones experimentales durante los dos últimos días de crecimiento en la ISS (fotoestimulación con luz roja y gravedad 1g en la primera fila, fotoestimulación y microgravedad en la segunda fila y microgravedad a bordo en oscuridad en la tercera fila). Se muestran a la derecha la escala de expresión (como logaritmo en base 2 del ratio entre el número relativo de lecturas de RNAseq) promedio en cada pixel/cluster así como la distribución de genes en cada cluster (panel inferior). Se observan patrones diferenciales entre genotipos en función de la estimulación con luz roja y la microgravedad.

Sobreexpresados en <i>nuc 1</i> en microgravedad con fotoestimulación	Sobreexpresados en microgravedad con fotoestimulación, y en <i>nuc 2</i> sin ella	Reprimidos en 1g y fotoestimulación solo en <i>nuc 1</i>
Membrana de plastidios 6,51E-59	Respuesta al agua 3,22E-8	Diferenciación cel. epidérmicas de la raíz 4,20E-6
Membrana fotosintética 1,38E-57	Respuesta a sequía 4,03E-6	Actividad oxidoreductasa 4,79E-5
Fotosíntesis/Reacción a la luz 2,59E-16	Respuesta al calor 1,50E-3	Actividad antioxidante 2,74E-4
Lumen de los plastidios 4,39E-16	Respuesta a ROS 4,65E-2	Diferenciación de pelos radiculares 2,33E-4
Fotosistemas 2,70E-12	Almacenamiento de lípidos 2,98E-2	Maduración celular 2,33E-4
Generación de precursores metabólicos y energía 9,78E-12	Respuesta a la intensidad de la luz 1,87E-2	Organización y biogénesis de la pared celular 8,88E-3

**Tabla 17. Análisis preliminar de la expresión diferencial de genes de respuesta a estrés en el genotipo silvestre (Col-0) y en los dos mutantes de nucleolina (*nuc 1* y *nuc 2*).** Se han seleccionado directamente de los paneles GEDI en la figuras 51 y 52 los listados de genes de los clusters con una respuesta diferencial clara entre genotipos, obteniéndose tres resultados relevantes (incluidos en cada columna) por su enriquecimiento funcional en BINGO (se muestra el valor p con FDR).

### 2.2.2. Análisis funcional: Categorías COG (*Clusters of Orthologous Groups*) y GO (*Gene Ontology*)

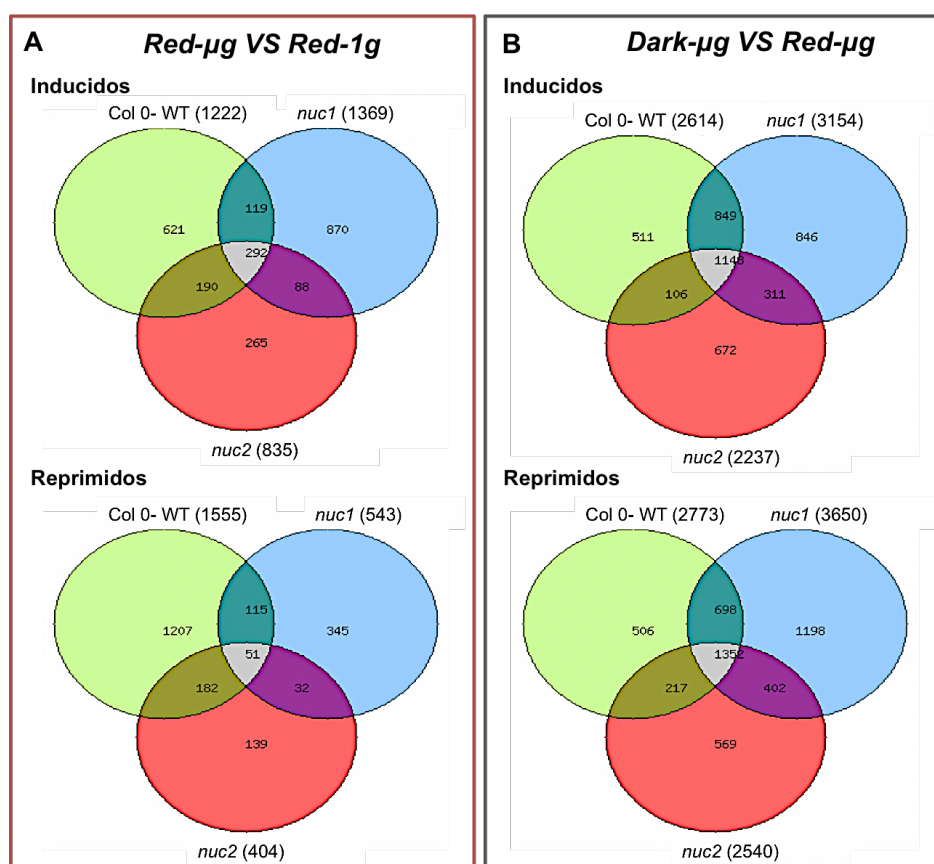
A la vista de los resultados iniciales decidimos profundizar en la caracterización del tipo de genes que están siendo expresados diferencialmente en cada condición ambiental y genotipo, para lo que se realizó un análisis funcional más exhaustivo. Las listas de genes obtenidas tras comparar la expresión (número de lecturas de secuencias) de cada gen y la eliminación de falsos positivos (FDR  $p < 0,05$ ) fueron utilizadas para realizar diagramas de Venn y conocer el número de genes cuya expresión cambia de forma similar o no entre genotipos ( $\log_2 \text{ratio} \geq 1,5$ ) en las comparaciones *Red- $\mu$ g VS Red-1g* y *Dark- $\mu$ g VS Red- $\mu$ g* (FIGURA 58). La tercera comparación, *Dark- $\mu$ g VS Red-1g*, en los siguientes análisis presentados no se describe debido a la similitud de su respuesta mostrada por el análisis de GEDI, respecto a la segunda comparación.

El número de genes desregulados debido a la falta de gravedad en presencia de fotoestimulación es 2.777 en el genotipo silvestre, 1.912 en el mutante de la nucleolina 1 (*nuc1*) y 1.239 en el mutante de la nucleolina 2 (*nuc2*). En la línea WT de los 2.777 genes desregulados, 1.222 está inducida su expresión y 1.555 está reprimida su expresión. En el caso de *nuc1* el número de genes inducidos o reprimidos es 1.369 y 543 respectivamente. El mutante *nuc2* los genes inducidos en su expresión son 835 y reprimidos son 404. El número de genes compartidos con la misma respuesta entre las



tres líneas es muy bajo, siendo de 51 para los genes reprimidos y de 292 para los genes inducidos. En cambio, el número de genes exclusivos para cada genotipo es bastante alto, sobretudo para la línea WT en los genes con expresión reprimida (1.207) y para el mutante *nuc1* (870) en los genes con expresión inducida (FIGURA 58A).

En la comparación que nos permite conocer el efecto de la microgravedad en ausencia de cualquier otro estímulo tropístico el número de genes desregulados en el genotipo WT es de 5.387, de los cuales 2.614 tienen inducida su expresión y 2.773 reprimida. En el mutante de la nucleolina 1 el número de genes que sufren inducción en su expresión en oscuridad respecto a la fotoestimulación con luz roja es 3.154 y los que sufren una represión es 3.650 (total = 6.804). En el mutante *nuc2* se produjo un cambio de expresión en 4.777, teniendo una expresión inducida 2.237 genes y reprimida 2.540 genes. En esta comparación el número de genes compartidos es mucho mayor que en la comparación anterior, siendo de 1.148 para genes inducidos y 1.352 para los genes reprimidos (FIGURA 58B).



**Figura 58. Diagramas de Venn de la expresión diferencial para cada genotipo analizado.** Se muestra el número de genes con expresión diferencial solo en un genotipo o en las intersecciones cuando aparecen en las tres líneas de plántulas (Col 0 WT, *nuc1* y *nuc2*) en presencia de fotoestimulación (*Red-μg VS Red-1g* (A)) y en ausencia de ella (*Dark-μg VS Red-μg* (B)), analizándose por separado los genes con expresión inducida (parte superior) o reprimida (parte inferior) respecto a la condición tomada de referencia.

Los genes que mostraron un cambio en su expresión de  $\log_2 \text{ratio} \geq 1,5$ , tras ser filtrados los falsos positivos (FDR  $p < 0,05$ ), fueron utilizados para conocer a que categoría COG (*Clusters of Orthologous Groups*) pertenecen y cual es su porcentaje respecto del total de genes secuenciados (FIGURA 59).

En la comparación *Red- $\mu$ g VS Red-1g*, las tres líneas de plántulas de *Arabidopsis thaliana* analizadas muestran (Col 0-WT, *nuc1* y *nuc2*) que el porcentaje de genes desregulados que codifican para proteínas ortólogas no supera para ninguna de las categorías funcionales más de 20% del total de genes secuenciados. Además, las categorías COG que poseen un mayor porcentaje de genes con expresión diferencial en la condición *Red- $\mu$ g* respecto de la condición estándar (*Red-1g*) son: Producción y conversión de energía (C), Mecanismos de defensa (V), Biosíntesis, transporte y catabolismo de metabolitos secundarios (Q), Biogénesis envoltura/membrana/pared celular (M) y Estructuras extracelulares (W). Los porcentajes más altos de genes desregulados en su expresión para cada uno de los grupos de proteínas ortólogas pertenecen a genes reprimidos para el genotipo WT y para genes inducidos para las dos líneas mutantes, siendo más marcada esta diferencia para el mutante *nuc1* (FIGURA 59).

El porcentaje de genes con expresión inducida o reprimida en microgravedad oscuridad respecto a la misma condición de gravedad pero con fotoestimulación con luz roja (*Dark- $\mu$ g VS Red- $\mu$ g*) es mayor que en la comparación anterior superando el 30% del total de genes secuenciados para las dos líneas mutantes (*nuc1* y *nuc2*) y el 25% para el genotipo silvestre (Col 0-WT).

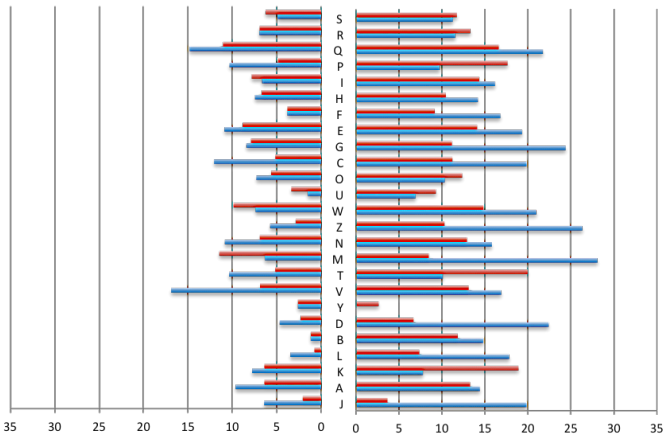
Las categorías COG que poseen un mayor porcentaje de genes con expresión reducida para la tres líneas de plantas son: Biogénesis envoltura/membrana/pared celular (M), Citoesqueleto (Z), Control ciclo celular, división celular, posición cromosomas (D), Biogénesis, estructura y traslación de ribosomas (J). En cambio, las categorías comunes con un mayor porcentaje de genes inducidos para los tres genotipos analizados son: Mecanismos transducción de señal (T) y Transcripción (K) (FIGURA 59).

El genotipo mutante *nuc2*, independientemente de la comparación, muestra un porcentaje de genes con expresión (*Red- $\mu$ g VS Red-1g* y *Dark- $\mu$ g VS Red- $\mu$ g*) desregulada mucho menor que las otras dos líneas de plantas de *Arabidopsis thaliana* incluidas en el la secuenciación a nivel de genoma completo (FIGURA 59).

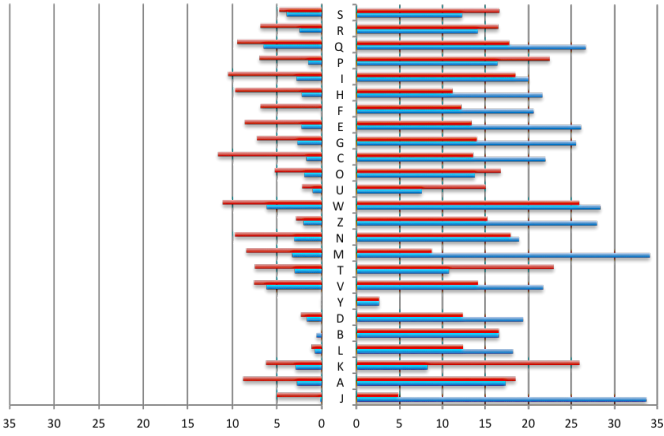
Red-μg VS Red-1g

Dark-μg VS Red-μg

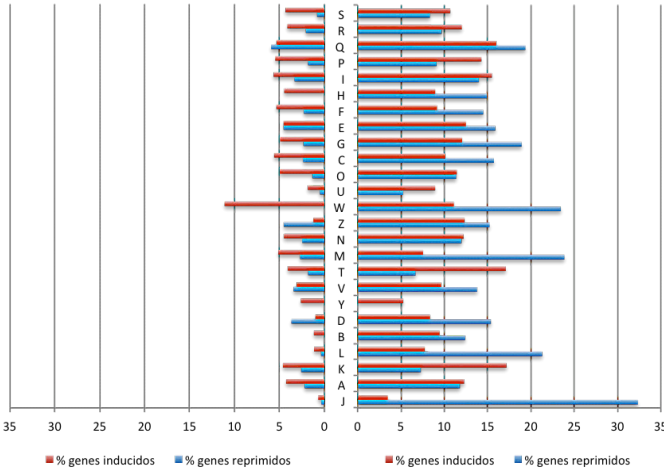
A) Col 0-WT



B) *nuc1*



C) *nuc2*



COG	Función/proceso
S	Función desconocida
R	Predicción solo función general
Q	Biosíntesis, transporte y catabolismo de metabolitos secundarios
P	Transporte y metabolismo de iones inorgánicos
I	Transporte y metabolismo de lípidos
H	Transporte y metabolismo de coenzimas
F	Transporte y metabolismo de ácidos nucleicos
E	Transporte y metabolismo de aminoácidos
G	Transporte y metabolismo de carbohidratos
C	Producción y conversión de energía
O	Modificación post-traslacional, recambio proteico, chaperonas
U	Transporte y secreción intracelular de vesículas
W	Estructuras extracelulares
Z	Citoesqueleto
N	Movilidad celular
M	Biogénesis envoltura/membrana/pared celular
T	Mecanismos transducción de señal
V	Mecanismos de defensa
Y	Estructura nuclear
D	Control ciclo celular, división celular, posición cromosomas
B	Dinámica y estructura cromatina
L	Replicación, recombinación y reparación
K	Transcripción
A	Modificación y procesamiento RNA
J	Biogénesis, estructura y traslación ribosomas

**Figura 59. Categorías COG (Clusters of Orthologous Groups).** Porcentaje de genes con expresión reprimida o inducida del total de genes secuenciados, que pertenecen o codifican para grupos de proteínas ortólogas, para las comparaciones, *Red-μg VS Red-1g* (parte izquierda) y *Dark-μg VS Red-μg* (parte derecha), y los genotipos, Col0-WT (A), *nuc1* (B) y *nuc2* (C).

Por último, para profundizar más en la interpretación del resultado de la secuenciación masiva se aplicaron los filtros indicados anteriormente ( $\log_2 \text{ ratio} \geq 1,5$ , y  $\text{FDR } p < 0,05$ ) en las listas de genes diferencialmente expresados en ambas comparaciones *Red- $\mu g$  VS Red-1g* y *Dark- $\mu g$  VS Red- $\mu g$*  y para las tres líneas analizadas (Col 0-WT, *nuc1* y *nuc2*). A continuación se utilizó la herramienta BINGO para localizar categorías funcionales GO (*Gene Ontology*) sobrerrepresentadas en cada una de esas listas usando la base de datos TAIR10 como referencia.

En la [Tabla 18](#) se muestran las categorías sobrerrepresentadas, detallando si los genes representados están inducidos o reprimidos, para los tres genotipos y la comparación *Red- $\mu g$  VS Red-1g*. Como se puede observar, las categorías funcionales sobrerrepresentadas pertenecen a procesos biológicos, componentes celulares y funciones moleculares que están relacionados principalmente con la fotosíntesis, la biogénesis y organización de la pared celular y la respuesta a estímulos, tanto bióticos como abióticos, así como a hormonas. La mayoría de las categorías funcionales sobrerrepresentadas (Fotosíntesis y respuestas a estímulo lumínico, radiación y estrés) en la línea WT y *nuc2* se asocian con genes reprimidos, están también sobrerrepresentados en la línea *nuc1*, pero en este caso por estar la expresión de sus genes inducidos en comparación con el control o estándar (*Red 1g*).

Se confirma por tanto que el mutante *nuc1* es el único que presenta una inducción significativa en las categorías relacionadas con la respuesta al estímulo lumínico (Respuesta a la luz de alta intensidad, Respuesta a la luz de baja intensidad, Respuesta a la luz roja y Respuesta a la luz roja lejana) y, en cambio, esta inducción es común a los tres genotipos (Biogénesis de la pared celular, Membrana plasmática y Pared celular), cuando las plantas crecen en microgravedad real y fotoestimulación con luz roja.

Genes desregulados <i>Red-μg</i> VS <i>Red-1g</i>				
GO-ID	Descripción	Col-0 (p-valor)	<i>nuc1</i> (p-valor)	<i>nuc2</i> (p-valor)
<b>Procesos biológicos</b>				
15979	Fotosíntesis	- (9,05E-61)	+ (1,18E-61)	- (1,64E-04)
19684	Fotosíntesis, fase lumínica	- (1,02E-31)	+ (7,03E-33)	
19685	Fotosíntesis, fase oscura	- (1,69E-04)	+ (2,69E-06)	
15994	Metabolismo clorofila	- (5,74E-06)	+ (6,73E-05)	
50896	Respuesta a estímulos	- (5,04E-34)/ + (5,34E-18)	- (1,85E-02)/ + (5,62E-37)	- (1,28E-02)/ + (5,28E-16)
9725	Respuesta a hormonas	- (7,10E-10)/ + (2,83E-16)	+ (3,00E-19)	+ (1,59E-10)
9607	Respuesta a estímulos bióticos	- (2,79E-08)		
9628	Respuesta a estímulos abióticos	- (1,84E-13)/ + (4,50E-13)	+ (2,16E-26)	- (3,57E-02)/ + (4,51E-10)
9416	Respuesta estímulo lumínico	- (1,52E-11)	+ (1,97E-22)	
9644	Respuesta a luz de alta intensidad		+ (2,98E-04)	
9645	Respuesta a luz de baja intensidad		+ (1,28E-03)	
10114	Respuesta a luz roja		+ (1,24E-03)	
10218	Respuesta a luz roja lejana		+ (9,03E-03)	
9314	Respuesta a radiación	- (1,71E-10)	+ (4,27E-21)	
6950	Respuesta a estrés	- (3,71E-22)/ + (2,69E-09)	+ (1,84E-12)	+ (2,12E-08)
6952	Respuesta de defensa	- (1,23E-19)	+ (2,50E-04)	
6955	Respuesta inmune	- (2,12E-02)		
8152	Procesos metabólicos	- (3,71E-17)	+ (7,26E-09)	
19748	Procesos metabolismo secundario	- (2,61E-02)	- (5,17E-08)	
42546	Biogénesis pared celular	+ (5,18E-03)		
71555	Organización pared celular	+ (1,31E-05)	+ (2,38E-05)	
<b>Componentes celulares</b>				
9507	Cloroplasto	- (1,56E-67)	+ (2,88E-79)	
9523	Fotosistema I	- (1,99E-24)	+ (4,45E-26)	
9522	Fotosistema II	- (1,48E-22)	+ (1,05E-21)	
9579	Tilacoide	- (1,41E-105)	+ (3,93E-129)	- (4,05E-08)
5737	Citoplasma	- (2,00E-09)	+ (8,56E-13)	
5840	Ribosoma		+ (4,33E-02)	
44446	Orgánulo intracelular	- (7,31E-17)	+ (9,32E-31)	
31967	Envoltura orgánulo	- (8,34E-37)	+ (4,15E-44)	
9636	Plastidio	- (8,53E-66)	+ (5,56E-77)	- (5,67E-05)
9526	Envoltura plastidio	- (1,21E-62)	+ (4,39E-73)	- (2,84E-02)
5886	Membrana plasmática	+ (1,19E-04)	+ (1,71E-04)	
5618	Pared celular	+ (4,89E-08)	+ (4,18E-05)	
<b>Función molecular</b>				
16168	Unión clorofila	- (1,27E-13)	+ (2,50E-13)	
3824	Actividad catalítica	- (3,88E-10)		
16491	Actividad oxidoreductasa	- (1,88E-07)/ + (3,16E-02)	+ (6,29E-12)	
19843	Unión rRNA	- (1,12E-02)	+ (2,30E-04)	
46906	Unión tetrapirrol	- (1,55E-04)		

**Tabla 18. Categorías GO (*Gene Ontology*) o funcionales sobrerrepresentadas en la respuesta a microgravedad en presencia de luz roja (comparación *Red-μg* VS *Red-1g*) para las tres líneas de plantas de *Arabidopsis thaliana* (Col-0, *nuc1* y *nuc2*) analizadas. Se marcan con símbolos positivos la sobrerrepresentación de genes inducidos y con negativos la de genes reprimidos.**

El número de genes con expresión desregulada en las plantas sometidas a oscuridad durante los dos últimos días de su periodo de crecimiento (6 días) es mayor que en las plantas fotoestimuladas con luz roja durante ese mismo periodo, por lo que las categorías GO sobrerrepresentadas por estar sus genes inducidos o reprimidos respecto de la condición *Red-μg* aparecen en dos tablas respectivamente (TABLA 19 y TABLA 20). Como se puede observar en estas tablas la respuesta de la línea silvestre (WT) y de las dos líneas mutantes (*nuc1* y *nuc2*) es similar, en cuanto a que las mismas categorías están inducidas o reprimidas. También en esta segunda comparación, es notable el menor número de genes desregulados en el mutante *nuc2* y el mayor número en el WT.

Las categorías funcionales sobrerrepresentadas, ya sea por inducción o por represión de la expresión génica, son las de respuesta a estímulos abióticos (luz, radiación y temperatura), de respuesta a hormonas y a estrés (TABLA 19 y TABLA 20).

Las categorías relacionadas con la transcripción y regulación de la expresión génica son categorías sobrerrepresentadas por inducción en microgravedad y oscuridad en comparación con el mismo nivel de gravedad pero con fotoestimulación con luz roja. En concordancia con las categorías COG, los procesos de señalización de la señal y modificación post-traslacional de proteína (fosforilación/desfosforilación) también poseen muchos de sus genes con expresión inducida (TABLA 19).

En la Tabla 20 se puede observar que la mayoría de los genes con expresión reprimida están implicados en la fotosíntesis, metabolismo de carbohidratos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos y biogénesis de ribosomas. Además, es muy evidente que las condiciones de microgravedad y oscuridad, o lo que es lo mismo en ausencia de cualquier estímulo que oriente el crecimiento de la planta (efecto de la ausencia de gravedad) provoca una disminución en la expresión de genes relacionados con procesos biológicos vitales para la planta, como son la división celular (Ciclo celular, Replicación DNA) y el crecimiento celular (Procesamiento rRNA, Subunidades del ribosoma, Crecimiento celular, Regulación tamaño celular) vitales al comienzo de su desarrollo.

Genes inducidos <i>Dark-μg</i> VS <i>Red-μg</i>				
GO-ID	Descripción	Col-0 (p-valor)	nuc1 (p-valor)	nuc2 (p-valor)
<b>Procesos biológicos</b>				
50896	Respuesta a estímulos	+ (1,22E-29)	+ (1,31E-16)	+ (5,38E-17)
9725	Respuesta a hormonas	+ (5,26E-14)	+ (1,91E-11)	+ (8,36E-10)
42221	Respuesta a estímulos químicos	+ (1,44E-29)	+ (6,15E-22)	+ (5,82E-19)
9628	Respuesta a estímulos abióticos	+ (8,28E-14)	+ (3,06E-17)	+ (1,98E-09)
9416	Respuesta a la luz	+ (5,58E-03)	+ (8,34E-03)	+ (5,57E-05)
9314	Respuesta a radiación	+ (1,74E-02)	+ (4,39E-02)	+ (5,35E-04)
9266	Respuesta a temperatura	+ (1,44E-05)	+ (1,38E-09)	
6950	Respuesta a estrés	+ (1,12E-14)	+ (6,27E-08)	+ (5,46E-03)
65007	Regulación biológica	+ (4,44E-22)	+ (5,78E-21)	+ (1,08E-16)
48519	Regulación negativa procesos biológicos	+ (1,63E-02)		
48518	Regulación positiva procesos biológicos		+ (8,99E-03)	
50793	Regulación procesos desarrollo		+ (1,04E-04)	+ (1,43E-03)
10468	Regulación expresión génica	+ (9,66E-13)	+ (3,05E-17)	+ (3,00E-09)
6355	Regulación transcripción, DNA-dependiente	+ (4,36E-12)	+ (1,18E-17)	+ (5,13E-09)
19222	Regulación procesos metabólicos	+ (6,06E-13)	+ (1,47E-16)	+ (1,52E-10)
23052	Señalización	+ (5,26E-14)	+ (2,08E-07)	+ (5,03E-14)
9755	Rutas señalización mediadas por hormonas	+ (4,59E-09)	+ (1,29E-04)	+ (1,48E-09)
6351	Transcripción, DNA-dependiente	+ (1,17E-11)	+ (8,74E-16)	+ (1,45E-06)
90304	Metabolismo ácidos nucleicos	+ (2,61E-03)	+ (6,27E-08)	
16070	Metabolismo RNA	+ (1,19E-06)	+ (4,41E-11)	
43412	Modificación macromoléculas	+ (1,39E-03)	+ (6,93E-06)	
43687	Modificación post-traslacional proteínas	+ (3,35E-07)	+ (2,17E-10)	+ (2,91E-02)
16311	Desfosforilación		+ (6,14E-05)	
16310	Fosforilación	+ (2,27E-05)		
<b>Componentes celulares</b>				
5634	Núcleo	+ (4,02E-21)	+ (4,08E-55)	+ (9,16E-13)
5654	Nucleoplasma		+ (2,62E-03)	
5886	Membrana plasmática	+ (1,42E-15)	+ (7,39E-05)	+ (1,19E-09)
<b>Función molecular</b>				
3824	Actividad catalítica	+ (2,94E-07)		+ (2,46E-06)
3700	Actividad factor transcripción	+ (3,43E-10)	+ (2,38E-13)	+ (7,03E-10)
16301	Actividad quinasa	+ (1,70E-10)	+ (4,29E-06)	+ (3,17E-03)
4871	Actividad señal de transducción	+ (9,54E-04)		
3677	Unión DNA	+ (1,24E-08)	+ (3,16E-14)	+ (3,17E-03)
43565	Unión secuencia específica DNA	+ (2,96E-04)	+ (4,46E-09)	
32553	Unión ribonucleótidos	+ (1,01E-09)		
166	Unión nucleótido	+ (8,65E-08)	+ (2,52E-03)	
5515	Unión proteínas	+ (3,19E-15)	+ (2,34E-27)	+ (1,39E-014)

**Tabla 19. Categorías GO (Gene Ontology) sobrerrepresentadas en los genes con expresión inducida en microgravedad y oscuridad durante los dos últimos días del periodo de crecimiento (comparación *Dark-μg* VS *Red-μg*) frente a un control fotoestimulado para las tres líneas de plantas de *Arabidopsis thaliana* (Col-0, *nuc1* y *nuc2*) analizadas.**

Genes reprimidos <i>Dark-μg</i> VS <i>Red-μg</i>				
GO-ID	Descripción	Col-0 (p-valor)	N1 (p-valor)	N2 (p-valor)
<b>Procesos biológicos</b>				
50896	Respuesta a estímulos	– (1,14E-07)	– (5,91E-13)	– (1,19E-12)
9725	Respuesta a hormonas			– (2,52E-02)
9628	Respuesta a estímulos abióticos	– (9,90E-09)	– (9,85E-14)	– (8,83E-25)
9416	Respuesta estímulos lumínico	– (2,98E-04)	– (6,09E-10)	– (1,09E-05)
9314	Respuesta a radiación	– (1,78E-04)	– (1,41E-09)	– (2,32E-06)
9266	Respuesta a temperatura			– (7,71E-12)
6950	Respuesta a estrés			– (2,38E-09)
44238	Metabolismo primario	– (2,59E-16)	– (1,92E-34)	– (3,42E-26)
19748	Metabolismo secundario	– (7,39E-16)	– (3,88E-15)	– (8,74E-09)
15979	Fotosíntesis	– (9,67E-22)	– (3,90E-52)	– (1,42E-18)
5975	Metabolismo carbohidratos	– (4,00E-28)	– (4,54E-26)	– (3,31E-13)
19538	Metabolismo proteínas		– (5,41E-03)	
6629	Metabolismo lípidos		– (1,96E-05)	
42546	Biogénesis pared celular	– (1,21E-05)	– (7,06E-04)	
55086	Metabolismo nucleósidos, nucleótidos y ácidos nucleicos	– (2,26E-02)	– (2,28E-02)	
6364	Procesamiento rRNA			– (2,52E-02)
42254	Biogénesis ribosomas		– (3,09E-06)	– (3,65E-20)
22613	Biogénesis complejo ribonucleoproteico		– (9,34E-04)	– (2,99E-16)
7049	Ciclo celular	– (4,01E-17)	– (1,64E-09)	– (6,94E-06)
278	Ciclo celular, mitosis	– (2,00E-04)	– (6,37E-03)	
51726	Regulación ciclo celular	– (6,02E-10)	– (9,07E-04)	
6260	Replicación DNA	– (3,42E-05)	– (1,33E-02)	– (1,26E-06)
16049	Crecimiento celular	– (5,58E-03)		
8361	Regulación tamaño celular	– (1,26E-02)		
48469	Maduración celular	– (1,26E-02)	– (1,22E-02)	
<b>Componentes celulares</b>				
15934	Subunidad mayor ribosoma	– (9,33E-19)	– (9,42E-38)	– (5,14E-42)
15935	Subunidad menor ribosoma	– (5,79E-04)	– (3,20E-18)	– (1,23E-34)
30529	Complejo ribonucleoproteico	– (3,40E-08)	– (1,76E-39)	– (4,05E-46)
22626	Ribosoma citosólico	– (1,82E-30)		
9507	Cloroplasto	– (3,32E-22)	– (5,52E-93)	– (4,87E-35)
5618	Pared celular	– (2,67E-41)	– (3,50E-58)	– (2,13E-23)
<b>Función molecular</b>				
3824	Actividad catalítica	– (4,63E-52)	– (1,64E-62)	– (5,36E-27)
16491	Actividad oxidoreductasa	– (3,79E-11)	– (2,37E-16)	– (2,72E-08)
4693	Actividad protein-quinasa dependiente de ciclina	– (6,45E-03)		
16168	Unión clorofila	– (7,16E-05)	– (1,45E-10)	
19843	Unión rRNA		– (9,97E-11)	
3735	Constituyente estructural ribosoma	– (5,52E-24)	– (5,71E-71)	– (1,58E-71)

**Tabla 20. Categorías GO (Gene Ontology) sobrerrepresentadas en los genes con expresión reprimida en microgravedad y oscuridad durante los dos últimos días del periodo de crecimiento (comparación *Dark-μg* VS *Red-μg*) frente a un control fotoestimulado para las tres líneas de plantas de *Arabidopsis thaliana* (Col-0, *nuc1* y *nuc2*) analizadas.**



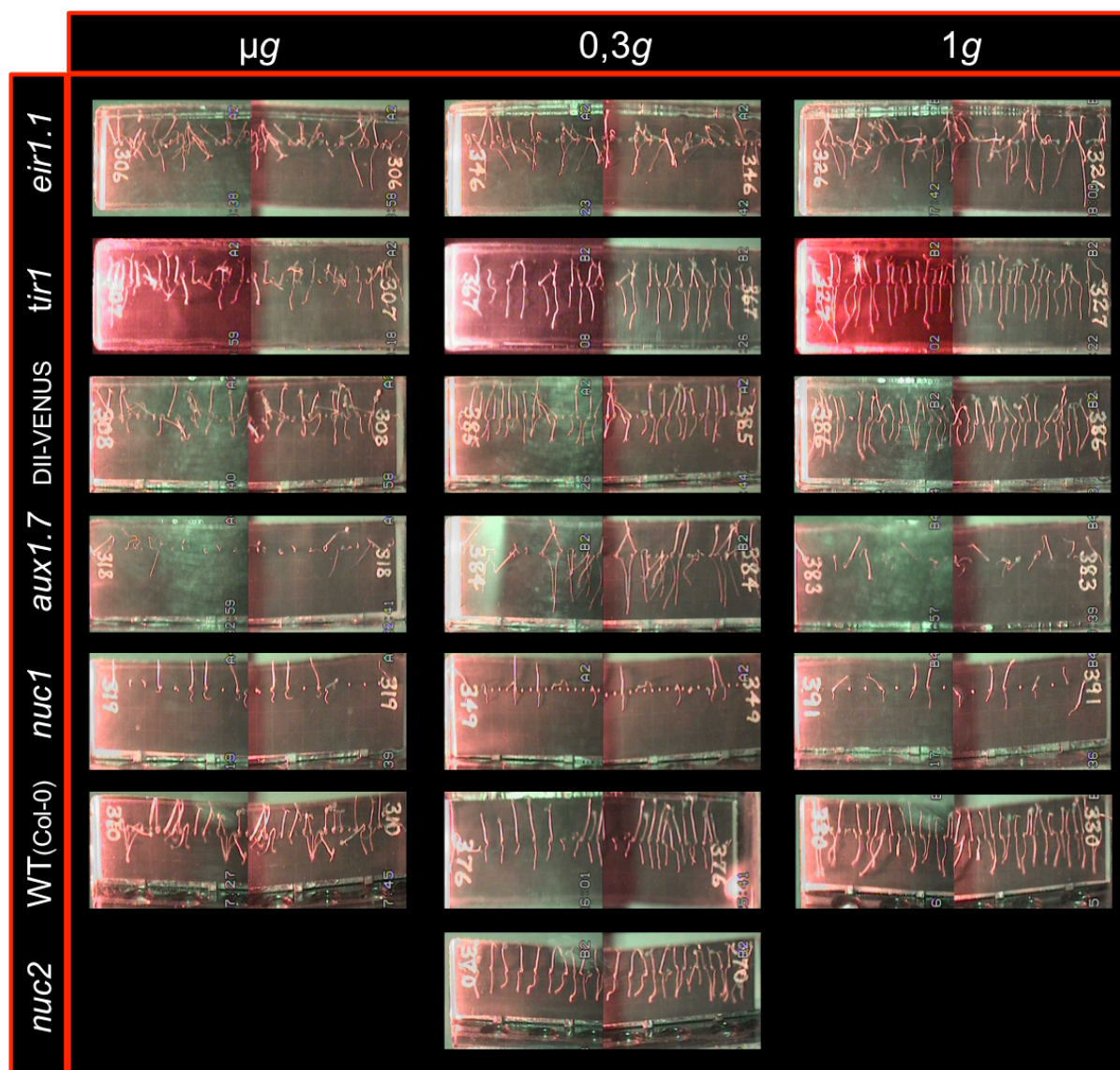
### **3. SEEDLING GROWTH 3: Estudios de proliferación y crecimiento celular en el meristemo radicular de plántulas de *Arabidopsis thaliana* en ambiente espacial (ISS y gravedad parcial) y su recuperación por luz roja (colección nucleolinas)**

En el experimento “Seedling Growth 3” germinaron semillas y crecieron plántulas de las mismas líneas utilizadas en la segunda fase de SG2 más la línea reportera del transporte de auxinas, DII-VENUS, en las mismas condiciones lumínicas que en esta fase. Además, en este tercer experimento espacial se incluyó un nivel parcial de gravedad (0,3g).

La principal diferencia entre SG3 y los otros dos experimentos espaciales fue la fijación de las muestras en el interior del *cassette* mediante el dispositivo Fixbox, lo que nos ha permitido estudiar el crecimiento y la proliferación celular en el meristemo radicular de plántulas crecidas en un ambiente espacial, mediante técnicas de microscopía y así poder completar los análisis a nivel molecular con estudios a nivel celular.

#### **3.1. Estudio morfométrico de la raíz**

En este último experimento espacial, al igual que en los dos anteriores, se midió la longitud de las raíces en las imágenes tomadas al final del periodo de crecimiento (6 días), para ambos tratamientos lumínicos (oscuridad y luz roja), durante los dos últimos días de este periodo y para las tres condiciones de gravedad aplicadas ( $\mu g$ , 0,3g y 1g) (FIGURA 60).

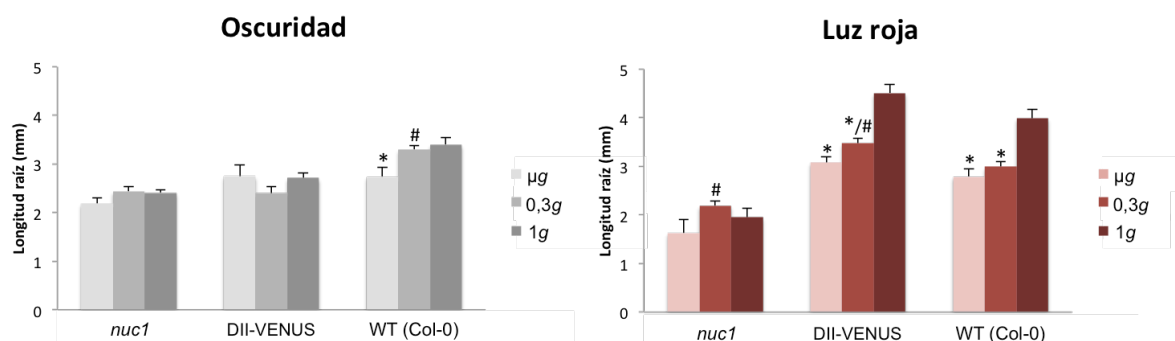


**Figura 60.** Imágenes de *cassettes* tomadas a tiempo real en la ISS al final del periodo de crecimiento del experimento SG3. En la figura se muestra un *cassette* perteneciente a cada genotipo (WT-Col-0, DII-VENUS, *aux1.7*, *eir1.1*, *tir1*, *nuc1* y *nuc2*) de plántulas fotoestimuladas los dos últimos días del periodo de crecimiento con luz roja unidireccional, para cada condición de gravedad aplicada ( $\mu g$ , 0,3g y 1g).

La longitud de la raíz primaria en las plántulas sometidas a oscuridad durante los dos últimos días de crecimiento no mostró diferencias significativas entre los niveles de gravedad en la mayoría de las muestras. Únicamente el genotipo silvestre (WT-Col-0) mostró una reducción en este parámetro en microgravedad real, pero no en el nivel de gravedad parcial, donde se iguala respecto al control en vuelo 1g (FIGURA 61).

Sin embargo, en las plántulas fotoestimuladas con luz roja unilateral constante durante el quinto y sexto día del periodo de crecimiento, se obtuvo una fuerte disminución en la longitud de la raíz en los dos niveles de gravedad experimentales en la línea DII-VENUS

y en la línea WT. En la línea mutante de nucleolina 1 (*nuc1*) las raíces más largas fueron las de las plántulas crecidas a 0,3g (FIGURA 61).



**Figura 61. Longitud de la raíz de las líneas de *Arabidopsis thaliana* germinadas y crecidas en la ISS durante el experimento SG3.** Los histogramas muestran la longitud de la raíz primaria de todas las líneas WT-Col-0, DII-VENUS y *nuc1*) durante el experimento SG3 para los dos regímenes de iluminación aplicados durante los dos últimos días de crecimiento (oscuridad y luz roja).

\* Diferencias significativas respecto al control en vuelo 1g ( $p < 0,05$  Test T-Student)

# Diferencias significativas respecto a  $\mu g$  ( $p < 0,05$  Test T-Student)

### 3.2. Estudio de la proliferación, crecimiento celular y transporte de auxinas en la raíz por técnicas de microscopía

Todas las plántulas crecidas en la “Run1” (Rotores A y B) y la mitad de las crecidas en la “Run 2” (Rotor A) del experimento SG3 fueron fijadas en el interior de los cassettes mediante el dispositivo diseñado para ello y denominado FixBox. Las muestras fijadas en paraformaldehído fueron utilizadas para estudiar parámetros de proliferación celular (nº células/mm) y crecimiento celular (área nucléolo) y evaluar la competencia meristemática de la raíz de estas plantas. En el experimento SG3 también se registró un incidente con el manejo de uno de los Fixboxes en órbita, que inhabilitó la fijación de las muestras de un contenedor experimental. Para evitar la pérdida total de las muestras se decidió congelarlas en vez de fijarlas. Curiosamente, las muestras afectadas correspondieron a las mismas condiciones que en el incidente de hidratación en SG2, es decir, la condición control 1g en oscuridad. Por ello, al igual que en el análisis del RNAseq, tomamos como condición control luz roja-1g y como la condición donde se observa el efecto de la gravedad sin ningún otro estímulo, oscuridad- $\mu g$ .

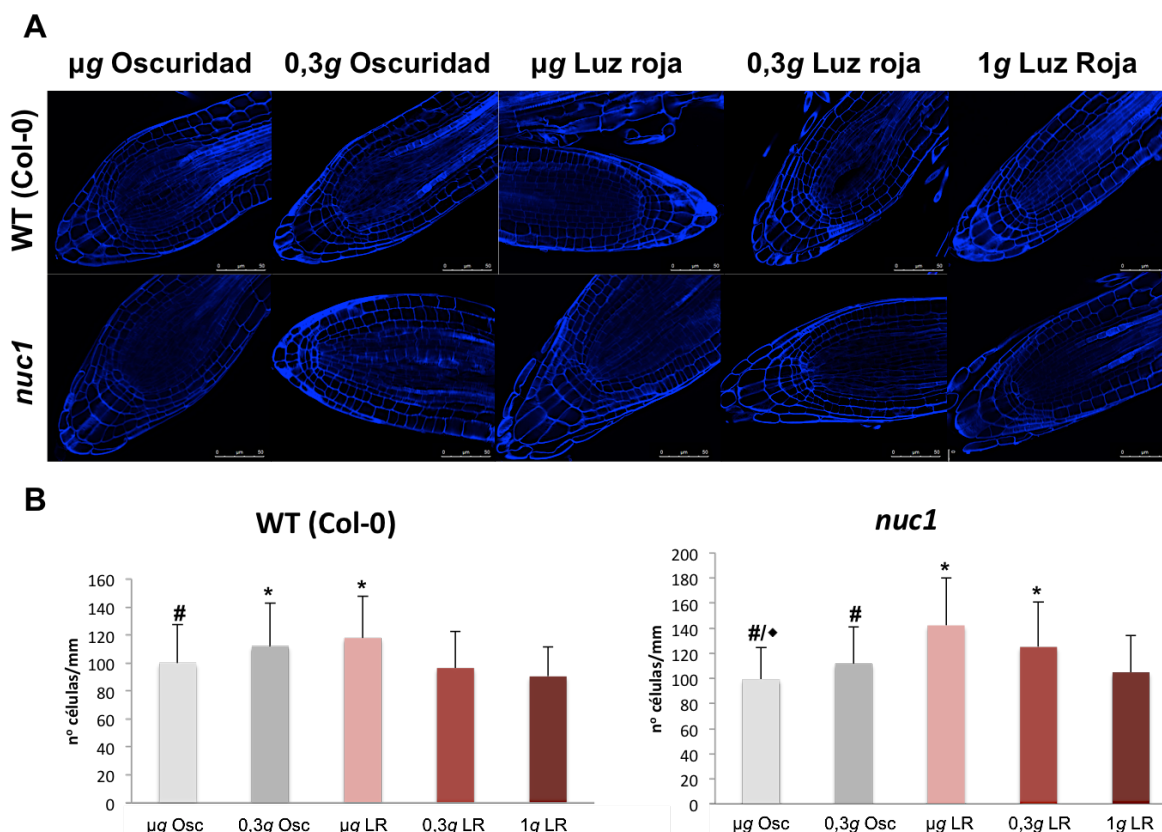
Las muestras fijadas en glutaraldehído han sido utilizadas principalmente para estudiar la ultraestructura y componente del nucléolo, y poder conocer el estatus de éste como indicador de crecimiento celular.

### **3.2.1. Proliferación celular: nº células/unidad de longitud (mm)**

La proliferación celular, medida como el número de células por unidad de longitud (mm) de las tres capas celulares que conforman el meristemo radicular, se determinó tras la tinción de membranas celulares con Reinassance ([FIGURA 62A](#)).

En el genotipo silvestre, bajo condiciones de fotoestimulación, se obtuvo una mayor proliferación en las condiciones microgravedad respecto del control 1g, mientras que el valor obtenido en gravedad parcial era muy similar al control. Sin fotoestimulación, los valores obtenidos en las dos condiciones de gravedad alterada son más altos que el control (1g-luz roja) pero el incremento observado en microgravedad es menor que bajo fotoactivación.

En la línea mutante de nucleolina 1 (*nuc1*) se obtuvo un fuerte aumento en el nº de células/mm en las muestras estimuladas con luz roja en las dos condiciones experimentales de gravedad alterada ( $\mu g$  y 0,3g) respecto a su correspondiente control (1g-luz roja). Este aumento no apareció en absoluto en ausencia de fotoestimulación (en comparación con el control 1g-luz roja) en ninguna de las condiciones de gravedad alterada ([FIGURA 62B](#)).



**Figura 62. Proliferación celular en plántulas de *Arabidopsis thaliana* crecidas durante el experimento espacial SG3.** El parámetro n° células/mm utilizado como indicador de proliferación celular ha sido medido en las tres capas celulares que forman el meristemo radicular. A) Imágenes de microscopía confocal tras la tinción de las membranas celulares con Reinassance, mostrando un corte central para cada condición experimental (microgravedad real-oscuridad, 0,3g-oscuridad, microgravedad real-luz roja, 0,3g-luz roja y 1g-luz roja) y genotipo analizado (WT-Col-0 y *nuc1*). Las barras indican 50  $\mu m$ . B) Resultados cuantitativos obtenidos tras la medición de este parámetro (media y desviación estándar).

\* Diferencias significativas respecto a 1g-luz roja ( $p < 0,05$  ANOVA y Test de Scheffe)

# Diferencias significativas respecto a  $\mu g$ -luz roja ( $p < 0,05$  ANOVA y Test de Scheffe)

◆ Diferencias significativas respecto a 0,3g-luz roja ( $p < 0,05$  ANOVA y Test de Scheffe)

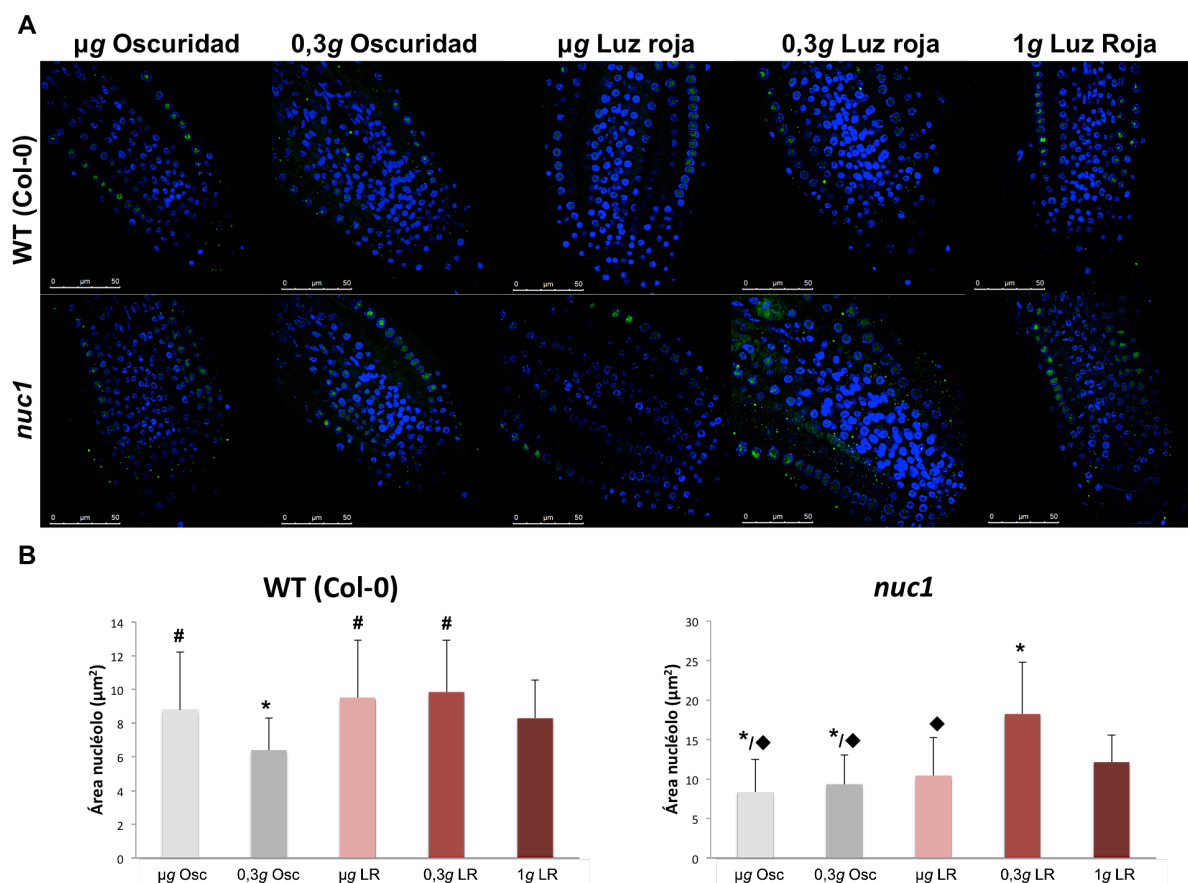
### 3.2.2. Crecimiento celular (Área del nucléolo, $\mu m^2$ )

El área marcada tras la realización de una inmunofluorescencia *in toto* con un anticuerpo frente a fibrilarina ha sido medida en las células meristemáticas de la punta de la raíz, como indicador de crecimiento celular (FIGURA 63A).

En el genotipo WT-Col-0 la única diferencia encontrada en este parámetro fue una fuerte reducción del área del nucléolo en las plántulas crecidas a 0,3g-oscuridad respecto a todas las demás condiciones.



En la línea mutante *nuc1* el área del nucléolo fue mayor de forma significativa en las plantas crecidas a 0,3g-luz roja, pero significativamente menor en ambas condiciones experimentales de gravedad y oscuridad, respecto de las que crecieron en gravedad control (1g) y fueron estimuladas con luz roja los dos últimos días de su periodo de crecimiento. (FIGURA 63B).



**Figura 63. Crecimiento celular de plantas germinadas y crecidas en la ISS durante el experimento espacial SG3.** El área del nucléolo marcada por el anticuerpo anti-fibrilarina ha sido medida en las células meristemáticas de la punta de la raíz, como un parámetro indicador del crecimiento celular. A) Imágenes tomadas en el microscopio láser confocal de un corte central tras realización de la inmunofluorescencia. El color azul corresponde con la tinción del DNA con DAPI y el color verde a la señal de fluorescencia del anticuerpo anti-fibrilarina. Las barras indican 50 μm. B) Resultados obtenidos (media y desviación estándar) tras la medición del área nucleolar para cada condición experimental (microgravedad real-oscuridad, 0,3g-oscuridad, microgravedad real-luz roja, 0,3g-luz roja y 1g-luz roja) para los dos genotipos analizados (WT-Col-0 y *nuc1*).

\* Diferencias significativas respecto a 1g-luz roja (p<0,05 ANOVA y Test de Scheffe)

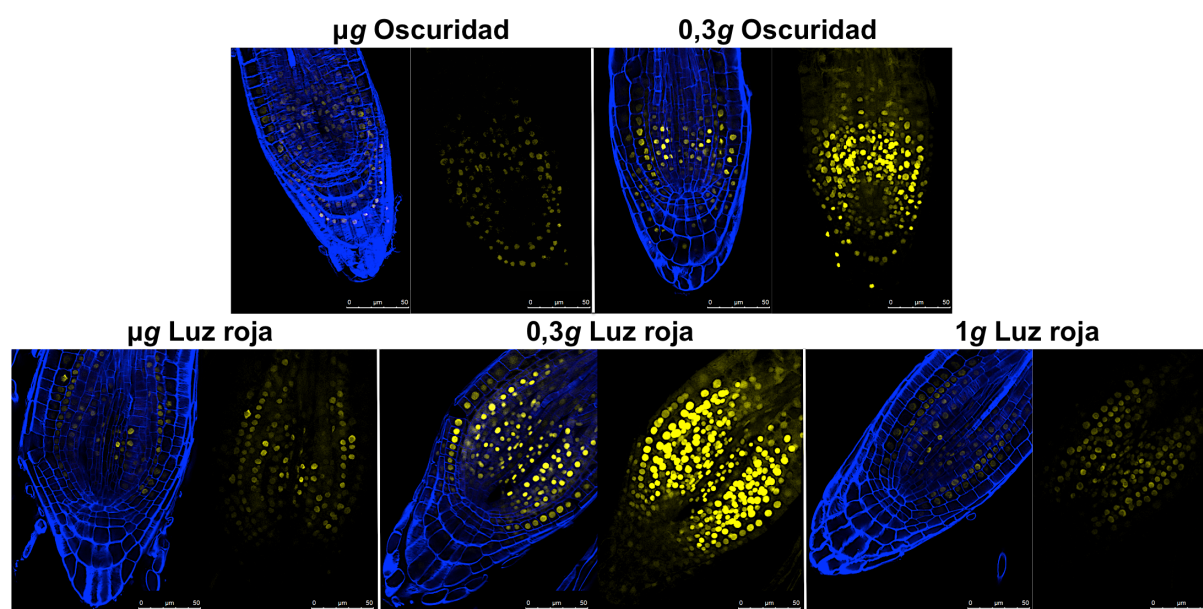
# Diferencias significativas respecto a 0,3g-oscuridad (p<0,05 ANOVA y Test de Scheffe)

♦ Diferencias significativas respecto a 0,3g-luz roja (p<0,05 ANOVA y Test de Scheffe)

### 3.2.3. Patrón de distribución de auxinas marcado por la línea transgénica DII-VENUS

La línea reportera del transporte de auxinas DII-VENUS fue incorporada en SG3 para estudiar y analizar si el ambiente espacial y en concreto la gravedad y el régimen lumínico afecta al transporte de esta fitohormona tan importante en la regulación de la proliferación y diferenciación celular. Esta línea posee una construcción que produce señal fluorescente (YFP) en ausencia de auxina y por tanto, nos permite relacionar esta señal con los niveles de la fitohormona.

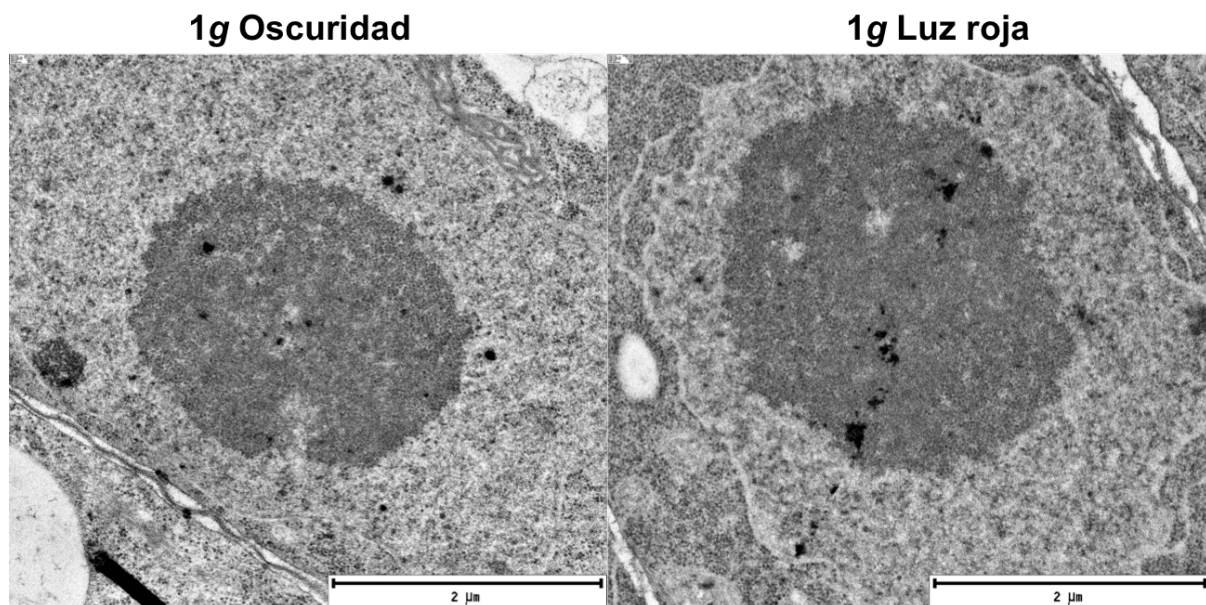
El patrón de fluorescencia obtenido en las diferentes condiciones de gravedad para cada régimen lumínico no difirió entre ellas, pero si lo hizo el patrón obtenido en las distintas condiciones lumínicas, independientemente del nivel de gravedad. Es decir, en oscuridad se observó fluorescencia en las capas meristemáticas del cilindro cortical, en la células que forman la columela y en las células de la capa lateral, no apareciendo fluorescencia en el centro quiescente. En cambio, en las muestras fotoestimuladas con luz roja unidireccional la señal de fluorescencia fue detectada en las mismas regiones que en las muestras sometidas a oscuridad, a excepción de las células de la columela (FIGURA 64).



**Figura 64. Patrón de distribución de auxinas de la línea transgénica DII-VENUS en el experimento SG-3.** Imágenes tomadas en el microscopio láser confocal correspondientes a cada condición de gravedad e iluminación durante los dos últimos días de crecimiento de las plantas (microgravedad real-oscuridad, 0,3g-oscuridad, microgravedad real-luz roja, 0,3g-luz roja y 1g-luz roja). En la figura se muestra para cada condición experimental un corte central teñido con Renaissance (parte izquierda) y la proyección máxima de la fluorescencia amarilla (parte derecha). Las barras indican 50 µm.

### 3.2.4. Ultraestructura del nucléolo (MET)

Las muestras fijadas en glutaraldehído han sido utilizadas para observar al microscopio electrónico de transmisión la ultraestructura del nucléolo. En el marco temporal de la realización del presente trabajo sólo ha sido posible presentar imágenes preliminares de la línea WT-Col-0 correspondientes a las condiciones 1g-oscuridad y 1g-luz roja que confirman un efecto positivo de la estimulación con luz roja en el tamaño nucleolar ([FIGURA 65](#)).



**Figura 65.** Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de muestras de la línea silvestre WT-Col-0 correspondientes al experimento SG3. Imágenes de nucléolos de muestras crecidas a gravedad control (1g) y los regímenes de iluminación (oscuridad y luz roja).





## Resultados

### **Experimentos realizados en instalaciones de Simulación de Microgravedad en Tierra (Ground Based Facilities, GBF) europeas**

- 4. Estudios de proliferación y crecimiento celular en el meristemo radicular de plántulas de *Arabidopsis thaliana* sometidas a diferentes niveles de gravedad en las instalaciones de ESTEC**
- 5. Estudios de proliferación y crecimiento celular en plántulas de *Arabidopsis thaliana* sometidas a microgravedad y distintos regímenes de iluminación y radiación en las instalaciones de Toulouse**

## **4. Estudios de proliferación y crecimiento celular en el meristemo radicular de plántulas de *Arabidopsis thaliana* sometidas a diferentes niveles de gravedad en las instalaciones de ESTEC**

Los experimentos realizados en esta instalación tuvieron como objetivo, además de complementar los estudios previos sobre crecimiento y desarrollo de las plantas en microgravedad simulada, validar los dos novedosos métodos de simulación de niveles parciales de gravedad.

Para ello, al igual que en los estudios previos realizados en el laboratorio se caracterizó la competencia meristemática de la raíz mediante parámetros de crecimiento y proliferación celular (Ana I. Manzano et al. 2013, 2009, Matía et al. 2009, 2010). Concretamente, se midió el número de células por unidad de longitud, el crecimiento celular (inmunofluorescencia anti-nucleolina1) y la expresión del gen de la ciclina B1(análisis histoquímico de la actividad  $\beta$ -glucuronidasa).

La germinación de las semillas y el crecimiento de las plántulas se llevó a cabo en oscuridad y con medio suplementado con sacarosa, por coherencia con los experimentos previos mencionados anteriormente.

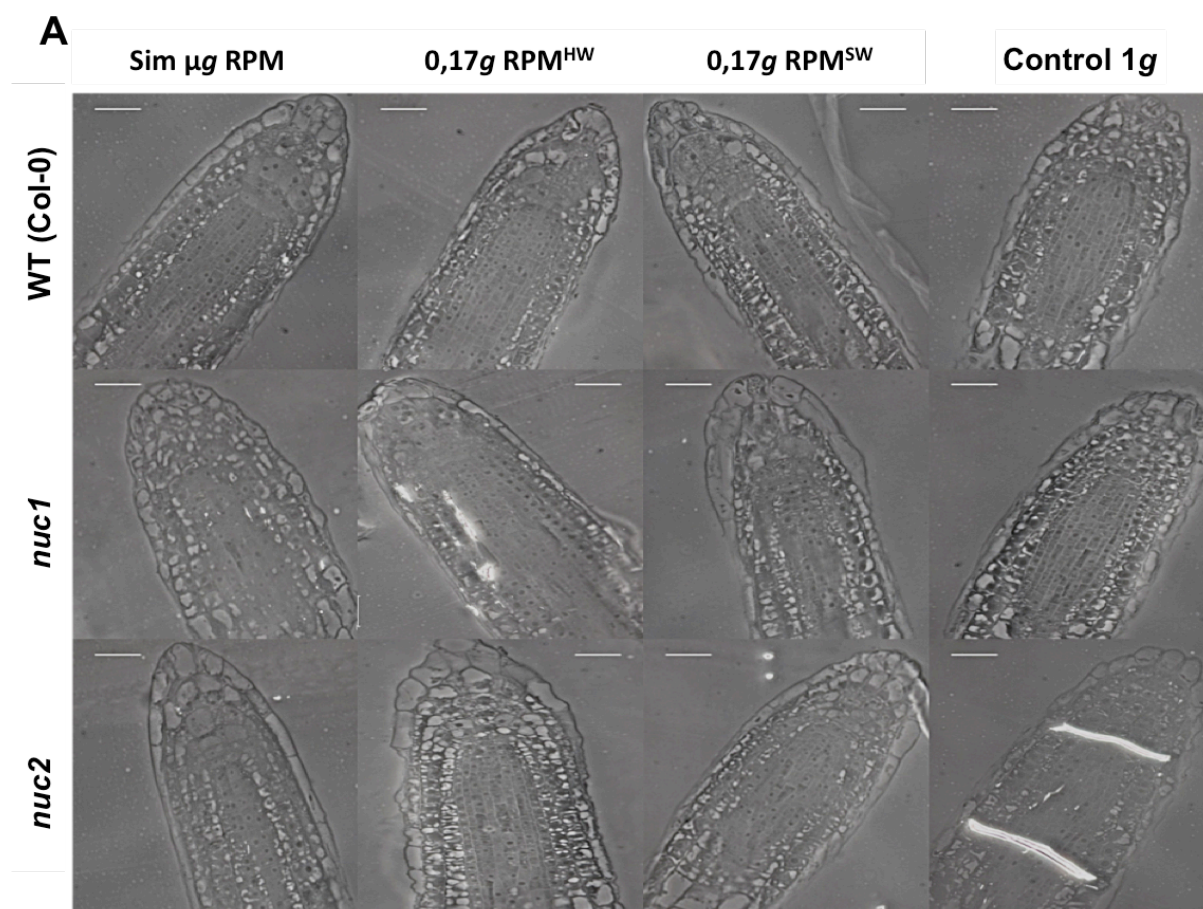
### **4.1. Proliferación celular en condiciones de microgravedad y gravedad parcial simuladas**

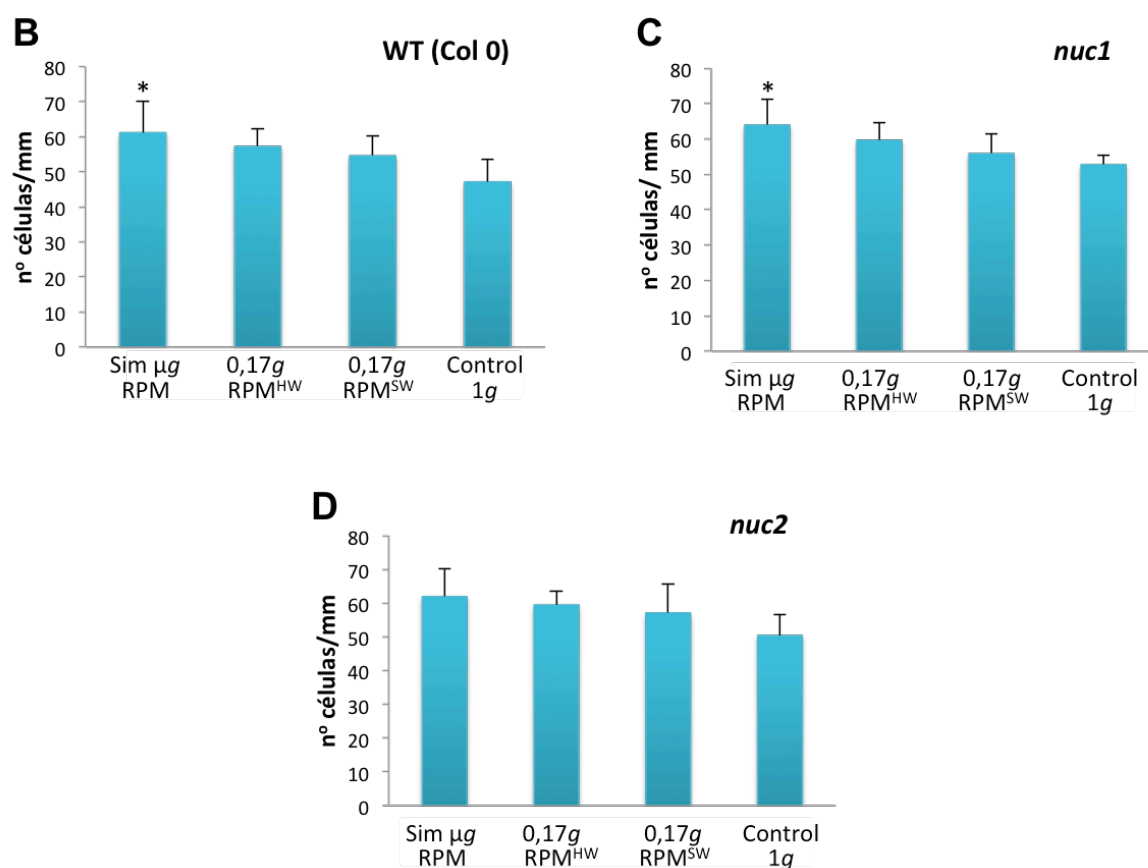
La proliferación celular se evaluó mediante la medición del ratio o tasa de producción celular local (*local cell proliferation rate* , LCPR), contando el número de células por unidad de longitud (mm) de la capas del cilindro cortical del meristemo radicular, sobre las imágenes de microscopía de contraste de fases tomadas de los cortes semifinos de las muestras embebidas en resina.

Este parámetro se midió en tres genotipos de plántulas de *Arabidopsis thaliana* (Col-0, *nuc1* y *nuc2*) sometidas a microgravedad mediante el modo regular de funcionamiento (RPM) y al nivel de gravedad parcial presente en la superficie lunar (0,17g) usando ambos métodos de simulación (RPM<sup>HW</sup> y RPM<sup>SW</sup>) (FIGURA 66A).

En consistencia con los anteriores experimentos realizados, tanto en microgravedad real como simulada, este parámetro fue significativamente mayor en las plántulas de genotipo silvestre Col-0 crecidas en microgravedad simulada (RPM) en comparación con el control estático 1g. Cuando el nivel de gravedad parcial fue analizado, se observó una tendencia similar, aunque el incremento en la proliferación fue menor y no es estadísticamente diferente (FIGURA 66B). En el mutante *nuc1* los resultados son muy similares siendo este parámetro significativamente mayor en microgravedad simulada respecto al correspondiente control (FIGURA 66C). En cambio, en el mutante *nuc2* se observa la misma tendencia que en los dos genotipos anteriores pero sin ser el incremento significativamente mayor en comparación con el control estático 1g (FIGURA 66D).

En todos los casos, los valores más bajos para la proliferación celular se obtuvieron en el control 1g. Además, no se observó ninguna diferencia entre los métodos de simulación de gravedad parcial en ninguno de los tres genotipos estudiados.





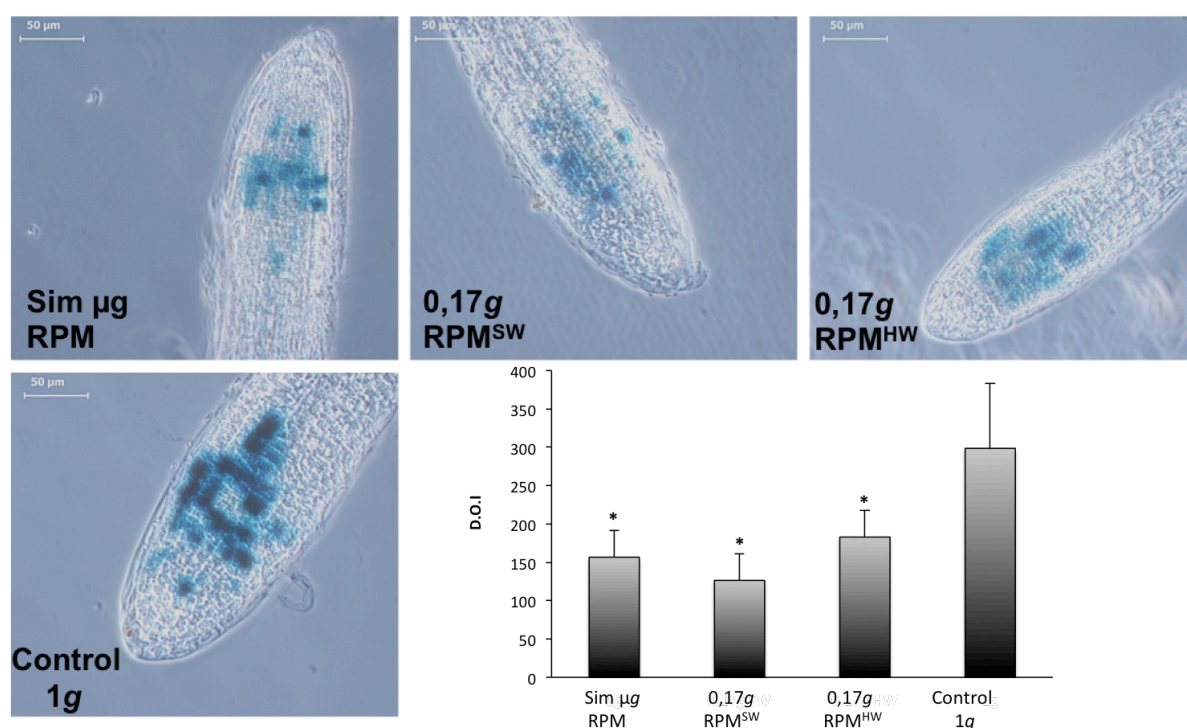
**Figura 66. Tasa de producción celular local (LCPR) en raíces expuestas a microgravedad simulada (Sim  $\mu g$  RPM), niveles parciales de gravedad (0,17g RPM<sup>HW</sup> y RPM<sup>SW</sup>) y el control estático 1g.** A) Imágenes tomadas a partir de los cortes semifinos de las raíces fijadas y embebidas en resina sobre las que se cuantificó el parámetro analizado. La barra indica 20 $\mu m$ . B) Proliferación celular media, medida como el número de células/mm en las tres capas de células meristemáticas radiculares, en las tres líneas de *Arabidopsis thaliana* (Col-0, *nuc1* y *nuc2*) estudiadas.

\* Diferencias significativas respecto al control estático 1g (Col-0 y *nuc1*  $p < 0,05$  ANOVA y Test de Scheffe, *nuc2*  $p < 0,0083$  Test U de Mann-Whitney-Wilcoxon)

## 4.2. Expresión del gen de la ciclina B1 en condiciones de microgravedad y gravedad parcial simuladas

El gen de la ciclina B1 es un marcador conocido de la proliferación celular por su importante función reguladora en ciclo celular, en concreto, de la transición G2/M (De Veylder et al. 2003). Por ello, para completar nuestro estudio sobre este parámetro hemos usado la línea transgénica *CYCB1;1:uidA*, que al albergar un gen reportero (GUS) permite estimar con gran fiabilidad la expresión *in situ* del gen de la ciclina B1 mediante la reacción histológica de la  $\beta$ -glucuronidasa (Colón-Carmona et al. 1999).

Una represión de la expresión (menor coloración GUS) de este gen en condiciones de microgravedad simulada ha sido descrita anteriormente en los experimentos previos del laboratorio (Ana I. Manzano et al. 2013, 2009, Matía et al. 2009, 2010) y al igual que en ellos, tanto bajo microgravedad (Sim  $\mu g$  RPM) como bajo gravedad parcial (0,17g RPM<sup>HW</sup> y RPM<sup>SW</sup>) se produce una disminución estadísticamente significativa de la expresión de este gen en comparación con el control estático 1g, incluso siendo mayor esta disminución a los niveles de gravedad presentes en la superficie de la Luna. No se han observado diferencias entre ambos métodos de simulación del nivel de gravedad parcial (FIGURA 67).



**Figura 67. Expresión del gen de la ciclina B1 en el meristemo radicular determinado por la señal GUS en la línea reportera *CYCB1;1:uidA*.** Un ejemplo de raíz para microgravedad simulada, la gravedad presente en la superficie lunar y el control estático 1g son mostradas. Las barras indican 50  $\mu m$ . En el gráfico se representa el valor medio de la cuantificación de la señal (D.O.I) con su correspondiente error o desviación estándar.

\* Diferencias significativas respecto al control estático 1g ( $p < 0,05$  ANOVA y Test de Scheffe)

### 4.3. Crecimiento celular en condiciones de microgravedad y gravedad parcial simuladas

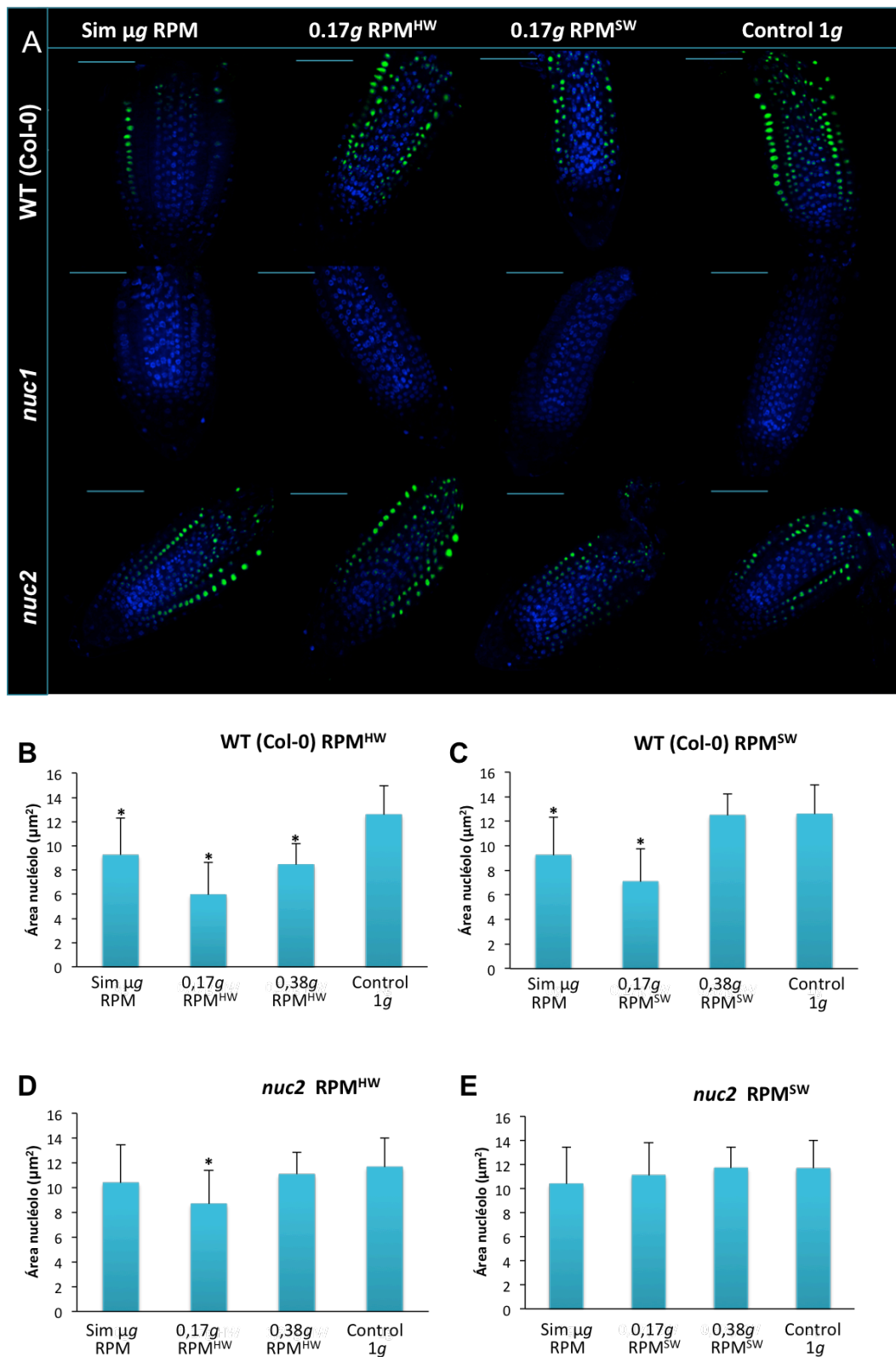
El tamaño nucleolar determinado como el área marcada por inmunofluorescencia anti-nucleolina 1 (NUC1) fue tomado como un indicador de la tasa de biogénesis de ribosomas e indirectamente como una medida del crecimiento celular (Medina et al. 2000; González-Camacho y Medina 2005, 2006). Este parámetro fue analizado en muestras expuestas a microgravedad simulada (Sim  $\mu g$  RPM), a la gravedad lunar (0,17g) (FIGURA 68A) y a la presente en la superficie de Marte (0,38g) comparándose con su correspondiente control 1g estático. Las condiciones de niveles de gravedad parcial han sido estudiadas utilizando ambos métodos de simulación, RPM<sup>HW</sup> y RPM<sup>SW</sup>.

La reducción en el tamaño nucleolar observada bajo condiciones de microgravedad real y microgravedad simulada en experimentos anteriores (Ana I. Manzano et al. 2009, 2013; Matía et al. 2010) ha sido confirmada en las plántulas de genotipo silvestre, como muestra la FIGURA 68. En cambio, en las plántulas mutantes *nuc2*, se obtuvo una reducción en el área de los nucléolos, pero sin ser estadísticamente significativa (FIGURA 68).

En las plántulas Col-0 bajo condiciones de gravedad equivalentes a las presentes en la Luna (0,17g) esta reducción en el área nucleolar es todavía mayor que la producida en condiciones de microgravedad simulada tanto en RPM<sup>HW</sup> (FIGURA 68B) como en RPM<sup>SW</sup> respecto al control estático 1g (FIGURA 68C). En condiciones de gravedad similares a Marte, en cambio, los dos métodos de simulación producen diferentes resultados, al obtenerse una disminución significativa en este parámetro (equivalente a la producida por la microgravedad simulada) en el método de simulación RPM<sup>HW</sup> (FIGURA 68B) pero no en el otro método, RPM<sup>SW</sup>, donde el resultado es muy similar al obtenido en el control estático 1g (FIGURA 68C).

Cuando analizamos las mismas condiciones experimentales en el mutante *nuc2* la misma tendencia se puede observar, pero solo obteniéndose en comparación con el correspondiente control, una reducción significativa del área nucleolar bajo las condiciones 0,17g RPM<sup>HW</sup> (FIGURA 68D) sin ser confirmada en 0,17g RPM<sup>SW</sup> (FIGURA 68E). No se detectan diferencias en este parámetro para la simulación de la gravedad marciana en este genotipo (FIGURA 68D y 68E).





**Figura 68. Tamaño celular en raíces expuestas a microgravedad simulada (Sim  $\mu g$  RPM), niveles parciales de gravedad (0,17g RPM<sup>HW</sup>/RPM<sup>SW</sup> y 0,38g RPM<sup>HW</sup>/RPM<sup>SW</sup>) y el control estático 1g.** A) Imágenes de inmunofluorescencia *in toto* de un corte o z central del meristemo radicular tomadas con el microscopio láser confocal en condiciones Sim  $\mu g$  RPM y 0,17g RPM<sup>HW</sup>/RPM<sup>SW</sup>. Los núcleos de las células se muestran en azul (tinción con DAPI) y los nucléolos se muestran en verde (señal anticuerpo anti-nucleolina1, excepto en las plántulas mutantes *nuc1*). Las barras indican 50 $\mu m$ . B) y C) Área media del nucléolo ( $\mu m^2$ ) en plántulas de genotipo silvestre Col-0. D) y E) Área media del nucléolo ( $\mu m^2$ ) en plántulas de genotipo mutante *nuc2*. \* Diferencias significativas respecto al control estático 1g ( $p < 0,05$  ANOVA y Test de Scheffe)



Para definir con una mayor precisión y claridad los efectos de los niveles de gravedad parcial simulados por estos dos novedosos métodos hemos clasificado los nucléolos en cinco grupos en función de su tamaño (FIGURA 69).

En el caso del genotipo silvestre (Col-0) al hacer esta clasificación se observa de forma muy clara que los nucléolos de menor tamaño solo aparecen en las condiciones de microgravedad simulada y en 0,17g RPM<sup>HW</sup>/RPM<sup>SW</sup>. En concreto, la mayoría de los nucléolos tienen un área dentro de los dos grupos de menor tamaño (<6  $\mu\text{m}^2$  y 6-9  $\mu\text{m}^2$ ). En contraste, en el nivel de gravedad correspondiente a Marte (0,38g RPM<sup>HW</sup>/RPM<sup>SW</sup>) y en el control 1g el tamaño de los nucléolos tiene una distribución más homogénea (FIGURA 69A y 69B).

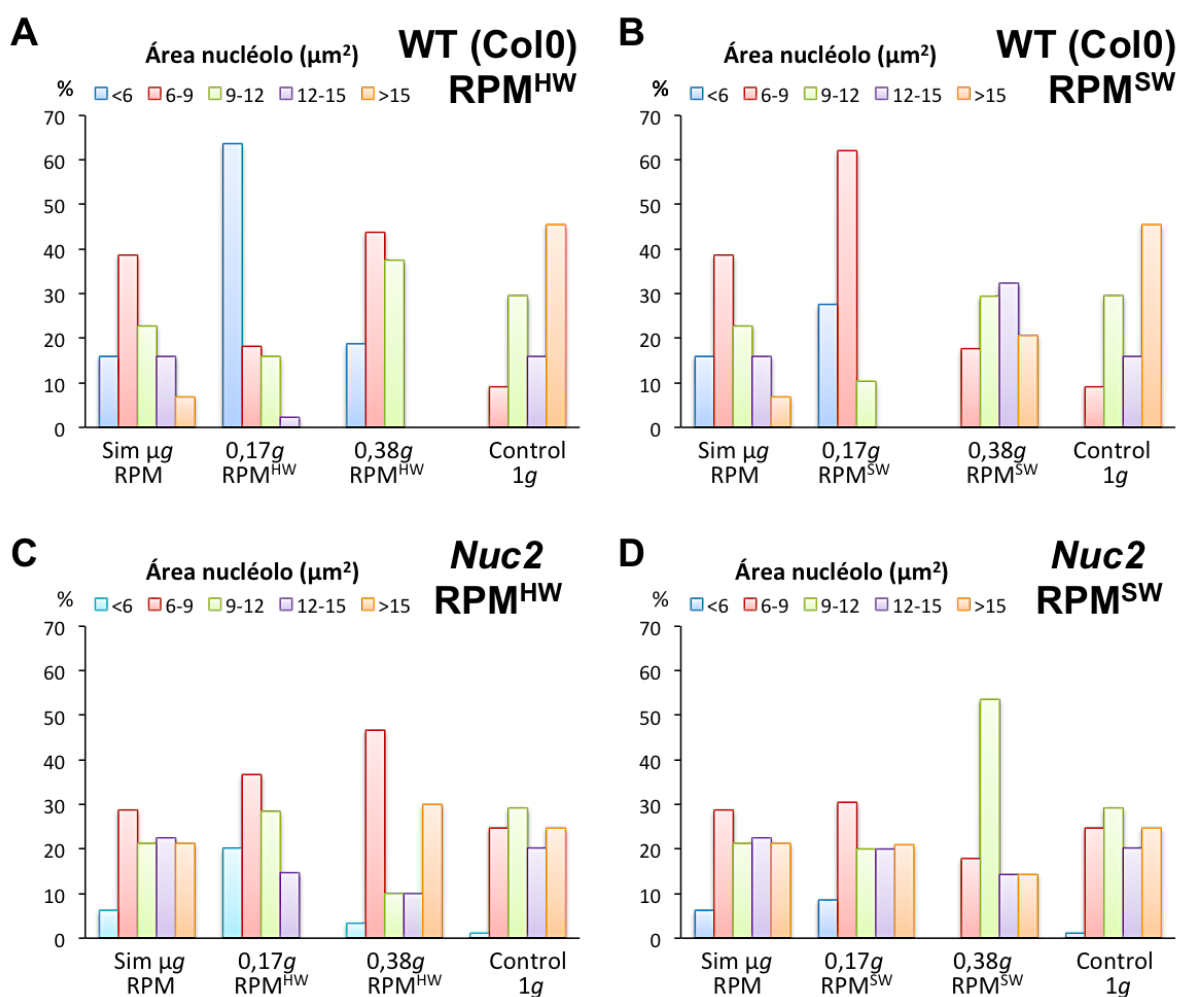
En el mutante *nuc2* se observa una distribución del área de los nucléolos similar en todas las condiciones estudiadas. Los nucléolos de menor tamaño (<6  $\mu\text{m}^2$ ) están presentes sobre todo en las condiciones de microgravedad simulada y en 0,17g RPM<sup>HW</sup>/RPM<sup>SW</sup> mientras que la distribución del área nucleolar en la gravedad parcial de Marte es más parecida a la distribución obtenida en el control estático 1g que a las dos condiciones anteriores. De todas formas la presencia de los grupos de nucléolos de menor tamaño, 6-9  $\mu\text{m}^2$  en RPM<sup>HW</sup> y 9-12  $\mu\text{m}^2$  en RPM<sup>SW</sup>, es muy elevada en comparación con el control (FIGURA 69C y 69D).

#### 4.4. Variación en el crecimiento celular en un gradiente desde microgravedad hasta 1g simuladas en la RPM<sup>HW</sup>

Finalmente, para completar el estudio del efecto de niveles parciales de gravedad sobre el crecimiento celular (área nucléolo), además de las condiciones mencionadas anteriormente se simulaban en la RPM con hardware modificado otras tres condiciones: 0,5g, 075g y 1g RPM<sup>HW</sup>. Este estudio se llevó a cabo, al igual que el anterior, tanto en plántulas *wild type* (Col-0) como en el mutante *nuc2* (FIGURA 70).

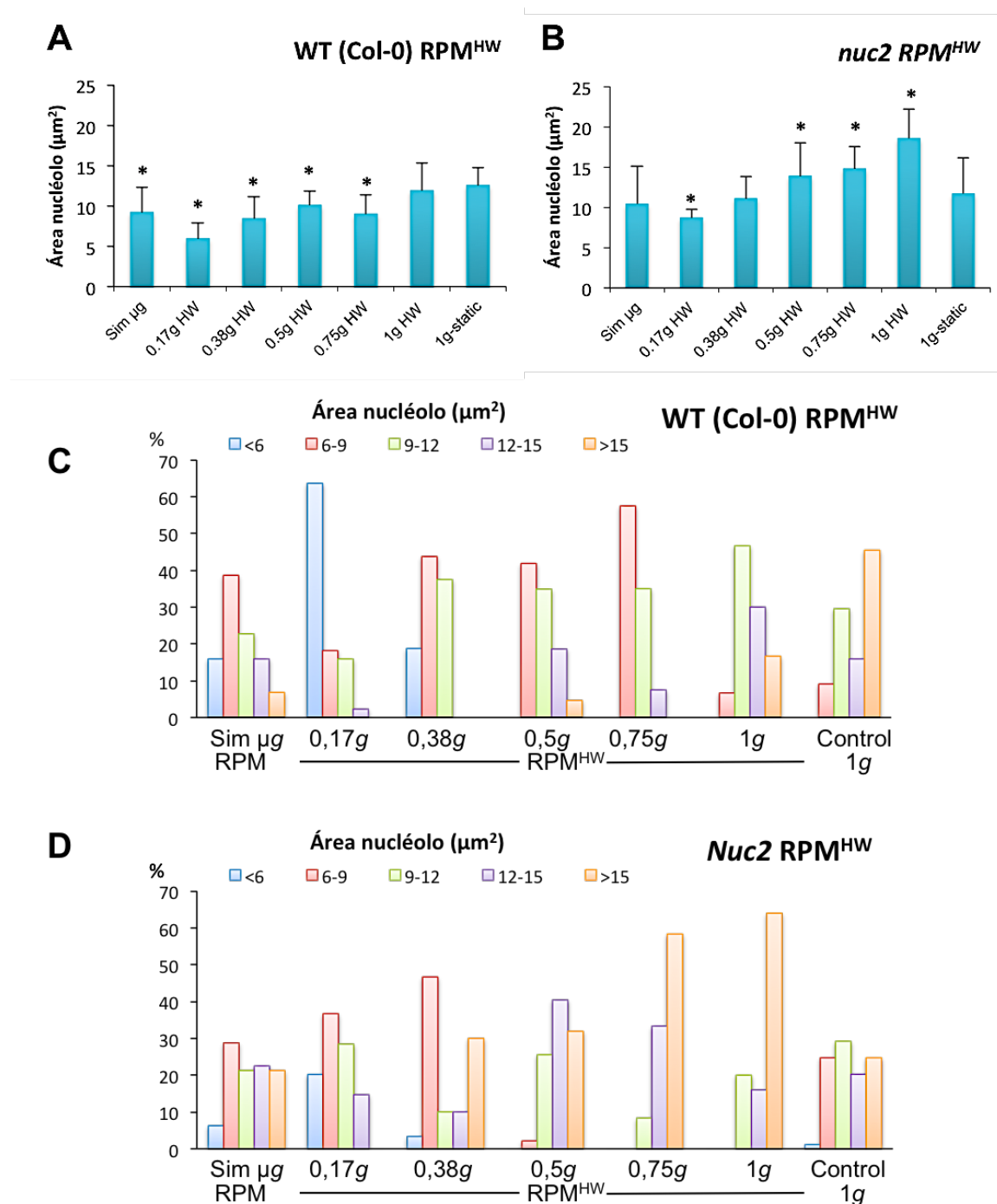
En ambos genotipos, la fuerte disminución que experimenta este parámetro en las condiciones de microgravedad simulada (Sim  $\mu\text{g}$  RPM) fue progresivamente menor a medida que aumenta el nivel de gravedad ensayado.

En el caso del genotipo silvestre esta disminución es estadísticamente significativa en todas las condiciones analizadas a excepción del 1g RPM<sup>HW</sup> donde se iguala con el control estático 1g, alcanzando un área de nucléolo equivalente (FIGURA 70A).



**Figura 69. Efecto de la microgravedad simulada y la gravedad parcial de la Luna y Marte en la distribución por tamaño de la población de nucléolos del meristemo radicular.** El porcentaje de nucléolos pertenecientes a cada uno de los grupos (<6, 6-9, 9-12, 12-15, y >15  $\mu m^2$ ) se representa para las condiciones de microgravedad simulada, 0,17g RPM<sup>HW</sup>/RPM<sup>SW</sup> y 0,38g RPM<sup>HW</sup>/RPM<sup>SW</sup> y el control estático 1g en A)/ B) plántulas de genotipo silvestre (Col-0) y C)/ D) en el mutante *nuc2* respectivamente.

En el caso de las plántulas mutantes *nuc2*, la recuperación en este parámetro es mucho más rápida alcanzándose un tamaño medio de nucléolo equivalente al control estático 1g cuando alcanzamos la gravedad presente en Marte (0,38g RPM<sup>HW</sup>) y siendo significativamente mayor en las condiciones 0,5g, 0,75g y 1g RPM<sup>HW</sup>, llegando a ser un 50% más grandes en esta última condición que en el control 1g estático (FIGURA 70B). Cuando realizamos la clasificación de la población nucleolar en función de su tamaño, confirmamos que los grupos de nucléolos más pequeños (<6  $\mu m^2$  y 6-9  $\mu m^2$ ) son sustituidos progresivamente, según va aumentado el nivel de gravedad simulado, por los grupos de nucléolos más grandes (12-15  $\mu m^2$  y >15  $\mu m^2$ ). Este efecto es particularmente visible en el mutante *nuc2* donde en la condición 1g RPM<sup>HW</sup> más del 60% de los nucléolos del meristemo radicular tienen un tamaño superior a 15  $\mu m^2$  (FIGURA 70C y 70D).



**Figura 70. Efecto progresivo en el crecimiento celular en distintos niveles de gravedad simulados por el método RPM<sup>HW</sup>.** Valor medio del área nucleolar (μm<sup>2</sup>) para las condiciones microgravedad simulada (Sim μg RPM), 0,17g/0,38g/0,5g/0,75g/1g RPM<sup>HW</sup> y el control estático 1g en A) el genotipo silvestre (Col-0) y en B) el mutante *nuc2*. Porcentaje de nucleólos pertenecientes a cada uno de los grupos (<6, 6-9, 9-12, 12-15, y >15 μm<sup>2</sup>) para las mismas condiciones de gravedad simuladas en C) plántulas de genotipo silvestre (Col-0) y D) en el mutante *nuc2*.

\* Diferencias significativas respecto al control estático 1g (p<0,05 ANOVA y Test de Scheffe)

## 4.5. Resumen de las variaciones en la proliferación y crecimiento celular en microgravedad y niveles parciales de gravedad simulados en oscuridad

A continuación, se presenta una tabla resumen (TABLA 21) con los resultados obtenidos en el experimento realizado a niveles parciales de gravedad, simulados en la RPM por dos nuevos métodos (RPM<sup>HW</sup> y RPM<sup>SW</sup>) y en microgravedad simulada por el modo estándar de funcionamiento de la RPM (Sim  $\mu g$  RPM), en la proliferación y crecimiento celular de varias líneas de plántulas de *Arabidopsis thaliana* (Col-0, *CYCB1;1:uidA*, *nuc1* y *nuc2*) tras 4 días de crecimiento a distintos niveles de gravedad y oscuridad en comparación con el control estático 1g.

Experimento RPM -ESTEC							
Parámetro		Proliferación celular (nºcélulas/mm)			Expresión <i>CYCB1;1</i> (D.O.I)	Crecimiento celular (área nucléolo, $\mu m^2$ )	
Línea		Col-0	<i>nuc1</i>	<i>nuc2</i>	<i>CYCB1;1:uidA</i>	Col-0	<i>nuc2</i>
Nivel de gravedad simulada	Sim $\mu g$ RPM	+	+	= (+)	-	-	= (-)
	0,17g RPM <sup>HW</sup>	= (+)	= (+)	= (+)	-	-	-
	0,17g RPM <sup>SW</sup>	= (+)	= (+)	= (+)	-	-	= (-)
	0,38g RPM <sup>HW</sup>					-	=
	0,38g RPM <sup>SW</sup>					=	=
	0,5g RPM <sup>HW</sup>					-	+
	0,75g RPM <sup>HW</sup>					-	+
	1g RPM <sup>HW</sup>					=	+

Tabla 21. Resumen de los efectos de distintos niveles de gravedad simulados con distintos modo de funcionamiento de la RPM en la proliferación y crecimiento celular del meristemo radicular de plántulas de *Arabidopsis thaliana* de 4 días de edad crecidas en oscuridad. En la tabla se indican con un signo + ó con un signo - los parámetros que aumentaron o disminuyeron de forma estadísticamente significativa respecto de su correspondiente control estático 1g para cada uno de las líneas utilizadas y condiciones ensayadas en este experimento. El signo = indica que no existen diferencias entre la condición experimental estudiada y la condición control, poniendo cuando es claro, entre paréntesis la tendencia de cambio del correspondiente parámetro (aumento + o disminución -)

## **5. Estudios de proliferación y crecimiento celular en plántulas de *Arabidopsis thaliana* sometidas a microgravedad y distintos regímenes de iluminación y radiación en las instalaciones de Toulouse**

Los experimentos realizados en la RPM de estas instalaciones, al disponer de un sistema de iluminación por LEDs que permite replicar las condiciones del experimento *Seedling Growth*, tienen el objeto de complementar los resultados obtenidos durante el experimento espacial sobre el efecto conjunto de la microgravedad y la fotoestimulación en el crecimiento y desarrollo de las plantas en sus primeros estadios de desarrollo.

El experimento espacial tiene muchas limitaciones a la hora de crecer plantas (número limitado de plántulas por *cassette*) y esta instalación nos ha permitido realizar un estudio mucho más amplio analizando más parámetros relacionados con el crecimiento y la proliferación celular y así obtener una visión más global.

En concreto, y en concordancia con el experimento *Seedling Growth*, las plántulas utilizadas en estos experimentos han crecido en un medio sin complementar con sacarosa y con unas condiciones de iluminación de fotoperiodo (16h luz blanca/8h oscuridad) o en oscuridad durante todo su periodo de crecimiento (6 días). Adicionalmente, se incluyeron en nuevos experimentos las condiciones de radiación que simulan las que se han registrado en el interior de la Estación Espacial Internacional.

### **5.1. Estudios en condiciones de microgravedad simulada y fotoperiodo**

En este experimento las plántulas de todos los genotipos utilizados (Col-0, *CYCB1;1:uidA*, *nuc1*, *nuc2* y DII-VENUS) crecieron durante 6 días con un régimen de iluminación de 16h con luz blanca y 8h en oscuridad (fotoperiodo), tanto las que fueron sometidas a microgravedad simulada como el correspondiente control estático 1g.

Tras su crecimiento se ha realizado un estudio de parámetros relacionados con el crecimiento y la proliferación celular en parte aérea (tallo) y meristemo radicular (raíz)

para poder distinguir la diferente respuesta de ambas partes de la planta sin que interfieran entre ellas.

En concreto, en la parte aérea de la planta se ha medido la longitud del tallo como parámetro general de crecimiento, y estudiado el proceso de biogénesis de ribosomas (crecimiento celular) analizando el procesamiento del transcrito primario pre-RNA 45S por la técnica semicuantitativa de biología molecular, RT-PCR. Además también se cuantificó la relación 25S/18S entre los fragmentos del pre-RNA ribosómico aprovechando la valoración electroforética de calidad del RNA total obtenido de la extracción.

En la raíz, el estudio ha sido mucho más completo analizando más parámetros, divididos en:

#### ***Técnicas de microscopía:***

- Longitud de la raíz
- nº células/mm (tasa local de proliferación celular)
- Expresión del gen de la ciclina B1 por análisis histoquímico de la actividad  $\beta$ -glucuronidasa (células en proliferación celular activa, durante la fase G2/M) en la línea *CYCB1;1:uidA*.
- Área del nucléolo marcada por inmunofluorescencia anti-fibrilarina (marcador de crecimiento celular)
- Patrón de transporte de auxinas (DII-VENUS)

#### ***Técnicas de biología molecular cuantitativas (qRT-PCR)***

- Análisis del procesamiento del pre-rRNA mediante cuantificación de RNAs intermediarios, marcadores de distintas fases del proceso, localizados en distintas regiones del transcrito primario: 5'ETS, 25S y 3'ETS
- Expresión de genes marcadores de proliferación celular: *CYCB1;2* y *CK2A;2*
- Expresión de genes marcadores de crecimiento celular: *NUC1*, *NUC2* y *FIB*
- Expresión de genes marcadores del transporte y percepción de auxinas: *EIR* y *TIR*

### 5.1.1. Crecimiento y Longitud de tallo y raíz

Las plántulas crecidas durante 6 días en posición vertical (control estático 1g) mostraron tallos orientados hacia arriba y raíces que crecen hacia abajo en los tres genotipos estudiados. Es decir, la parte aérea presentó un fototropismo positivo hacia la fuente de luz (LEDs situados en la parte superior) y un gravitropismo negativo (contrario a la fuerza de la gravedad hacia el interior de la Tierra), y la raíz presentó un fototropismo negativo y un gravitropismo positivo. En las plantas crecidas en el interior de la RPM (microgravedad simulada), las distintas partes de la planta presentaron la misma orientación que en el control 1g a excepción de que las raíces muestran una leve desorganización en su crecimiento (FIGURA 71) en concordancia con el mantenimiento del fototropismo y la pérdida del gravitropismo.

La longitud de las raíces se redujo levemente en todos los genotipos siendo estadísticamente significativa en comparación con su correspondiente control estático 1g solamente en el mutante *nuc2*. En cambio, en la longitud del tallo no se observa ninguna diferencia entre ambas condiciones experimentales analizadas (FIGURA 71).

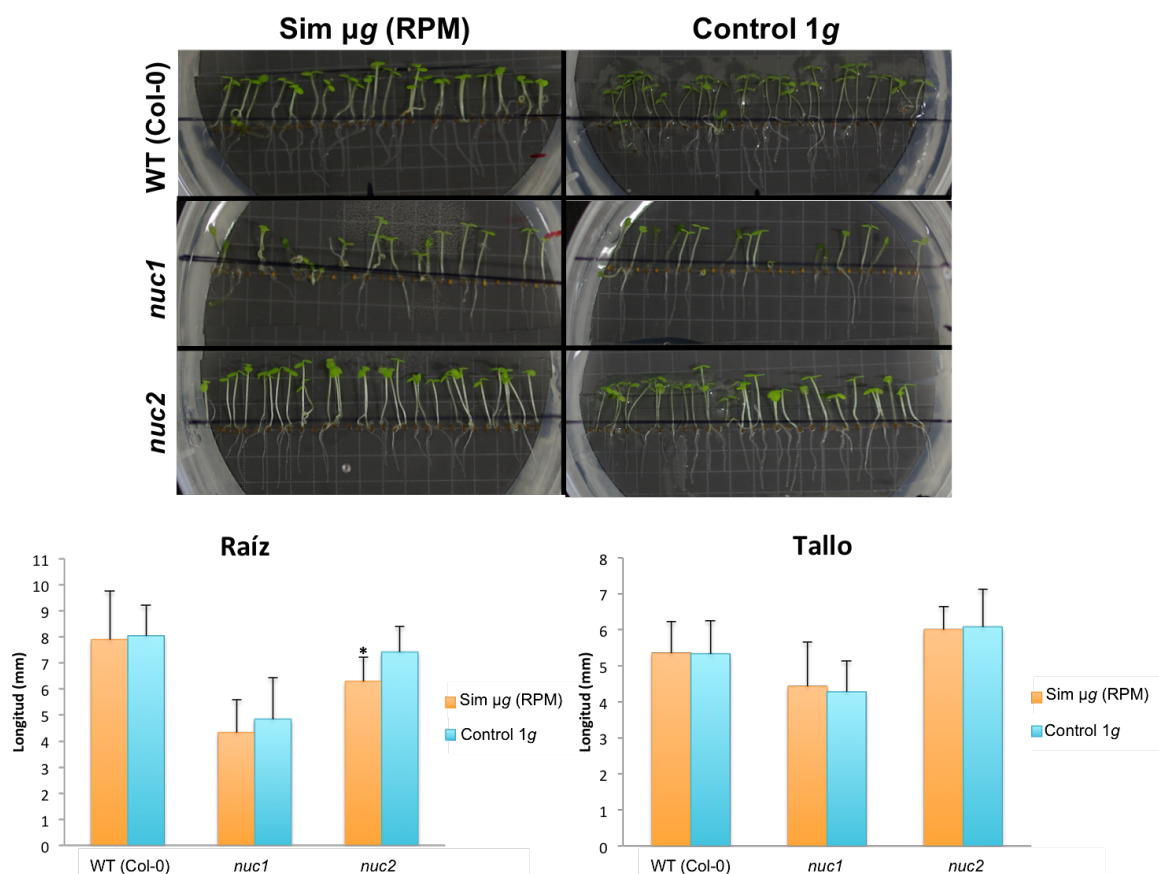
### 5.1.2. Estudio de la biogénesis de ribosomas

#### 5.1.2.1. Biogénesis de ribosomas en la parte aérea (tallo)

La biogénesis de ribosomas se estudió en los tallos de las plantas analizando el procesamiento del transcrito primario, pre-RNA 45S, en sus extremos 5'ETS y 3'ETS, mediante la técnica de biología molecular RT-PCR (FIGURA 72A).

En el extremo 5'ETS se utilizaron tres parejas de cebadores (*SWU*, *TIS* y *Sitio P*) para estudiar el procesamiento en este extremo conservándose el mismo patrón para cada una de ellas entre las plantas crecidas bajo condiciones de microgravedad simulada y su correspondiente control (FIGURA 72B).

El patrón de bandas obtenido de la amplificación en el extremo 3'ETS utilizando dos parejas de cebadores (3'ETS y *all Var*) en condiciones de gravedad terrestre (1g) en los dos genotipos mutantes, *nuc1* y *nuc2*, es diferente al obtenido para el genotipo silvestre (Col-0). En cambio, al comparar este patrón de bandas para cada uno de los genotipos entre las dos condiciones experimentales (Sim  $\mu$ g RPM y control 1g) no se obtuvo ninguna diferencia (FIGURA 72B).



**Figura 71. Plántulas de *Arabidopsis thaliana* crecidas durante 6 días con un régimen de iluminación de fotoperiodo y en condiciones de microgravedad simulada y su correspondiente control estático 1g.** Fotografías tomadas a la finalización del periodo de crecimiento (6 días) de cada uno de los genotipos estudiados: Col-0, *nuc1* y *nuc2* (parte superior). Longitud de raíces y tallos medidas en las fotografías tomadas a la finalización del experimento para cada uno de los genotipos utilizados y en ambas condiciones de gravedad (Sim µg RPM y control estático 1g) (parte inferior).

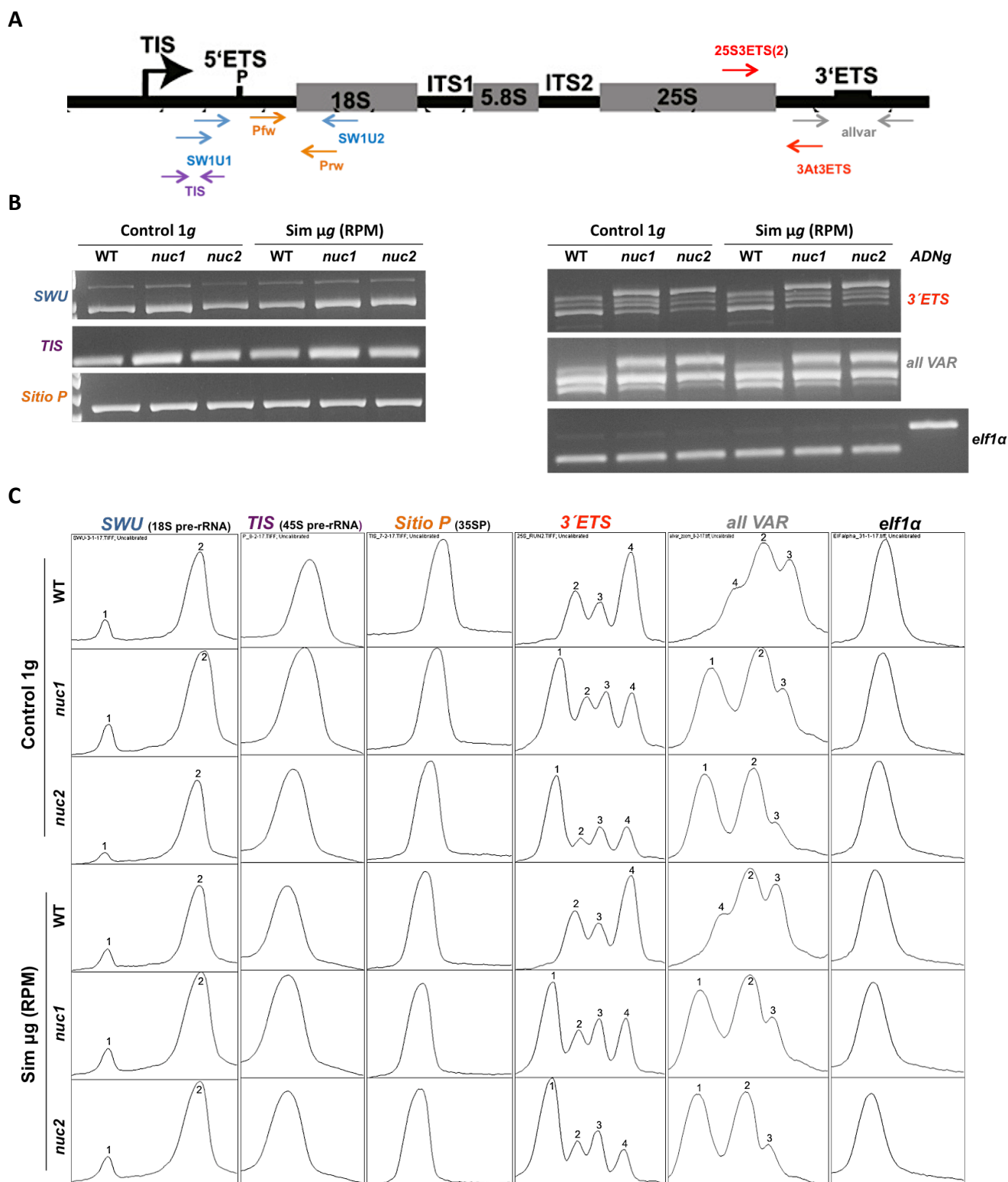
\* Diferencias significativas respecto al control estático 1g ( $p < 0,05$  Test T-Student)

Con el fin de comparar con mayor precisión las dos condiciones experimentales ensayadas, las fotografías de los geles fueron analizadas con un programa informático (ImageJ 1.49u) para cuantificar cada amplicón, obteniéndose una gráfica con picos, cuya altura se corresponde con la intensidad de la banda presente en el gel (FIGURA 72C).

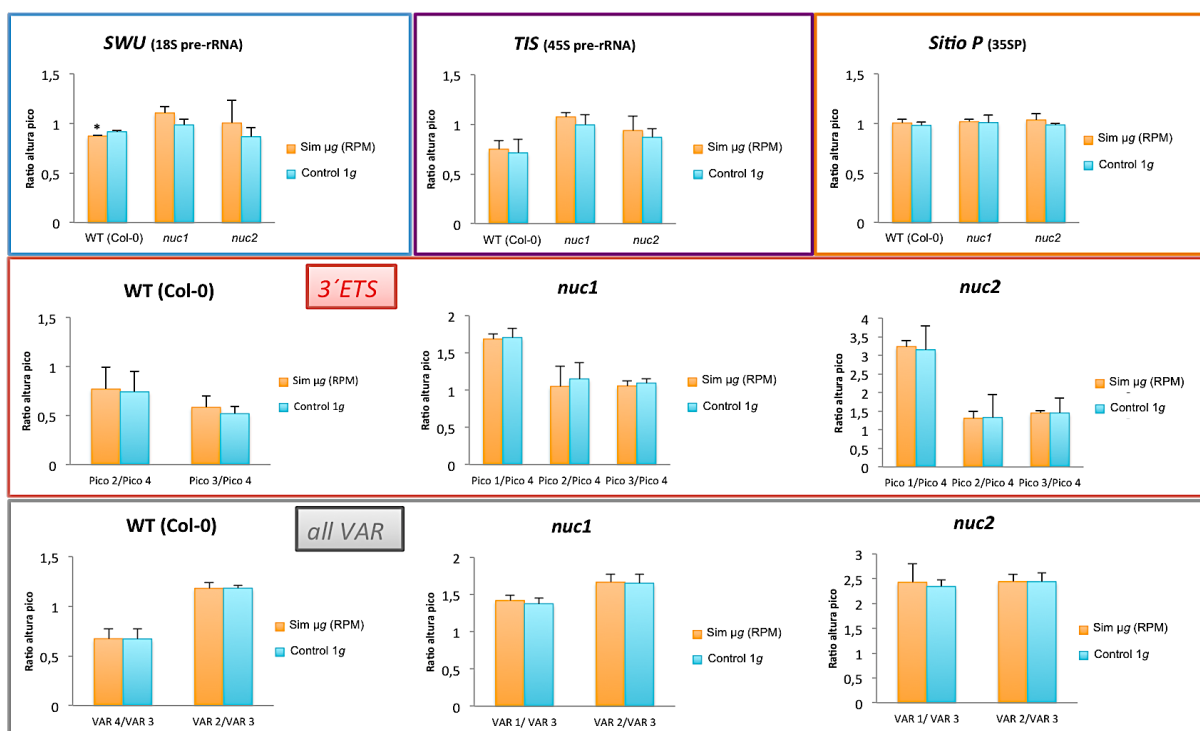
Para buscar diferencias en el patrón de bandas del extremo 3'ETS se determinó para cada condición y genotipo la relación o ratio entre cada una de las bandas (producto de amplificación) respecto a la banda de menor tamaño (pico 4 para los cebadores 3'ETS y VAR 3 para los cebadores *all VAR*). En cambio, para estudiar el efecto de la microgravedad simulada en el procesamiento del extremo 5'ETS (*SWU*, *TIS* y *Sitio P*) se relativizó la altura de cada uno de los picos con respecto a la amplificación del factor de transcripción *elf1*, utilizado como gen normalizador.



## Resultados



**Figura 72. Estudio de la biogénesis de ribosomas en la parte aérea (tallo) de plántulas crecidas en microgravedad simulada o gravedad terrestre con una régimen lumínico de fotoperiodo.** A) Esquema del transcrito primario, pre-RNA 45S, indicando la zona de amplificación de cada una de las parejas de cebadores utilizadas. B) Fotografía de las electroforesis tras las amplificaciones para cada uno de los genotipos (*wild type*, *nuc1* y *nuc2*) y las dos condiciones experimentales, Sim  $\mu$ g RPM y control estático 1g. C) Cuantificación de los distintos amplicones con ImageJ.



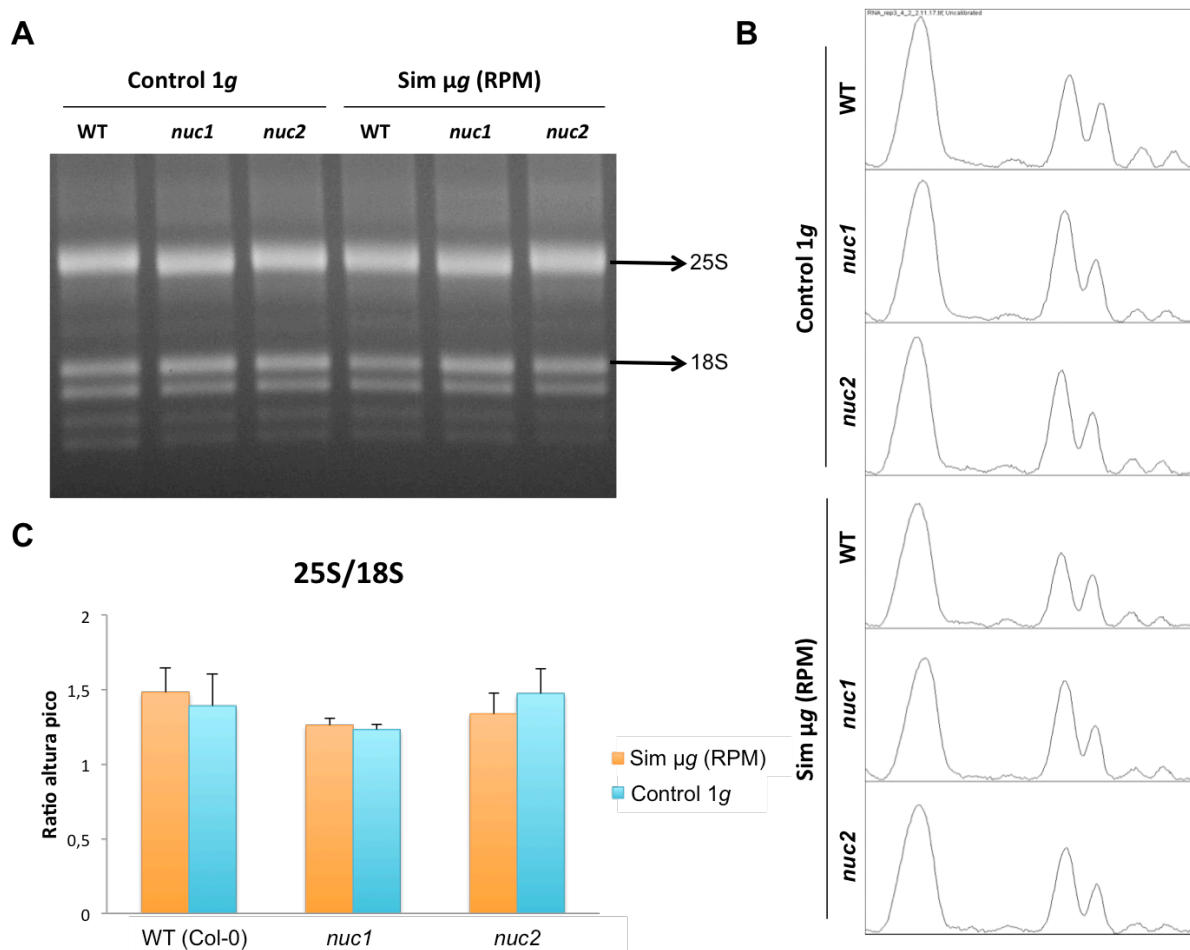
**Figura 73.** Gráficas mostrando el valor medio del ratio de entre cada amplicon (altura del pico obtenido para cada pareja de cebadores en cada uno de los genotipos y condiciones experimentales estudiadas).

\* Diferencias significativas respecto al control estático 1g ( $p < 0,05$  Test T-Student) (3 réplicas biológicas).

La comparación de este análisis mostró que no existen diferencias significativas para ninguno de los genotipos en el procesamiento del pre-RNA 45S, y por tanto, en la biogénesis de ribosomas bajo condiciones de microgravedad simulada, a excepción de *SWU* en el genotipo silvestre, el que se observa una pequeña reducción del ratio, estadísticamente significativa (FIGURA 73).

Con el fin de completar el estudio de la biogénesis de ribosomas en el tejido de la parte aérea de la planta, también analizamos la relación entre el RNA 25S/18S presente en el RNA total extraído de cada una de las muestras (FIGURA 74).

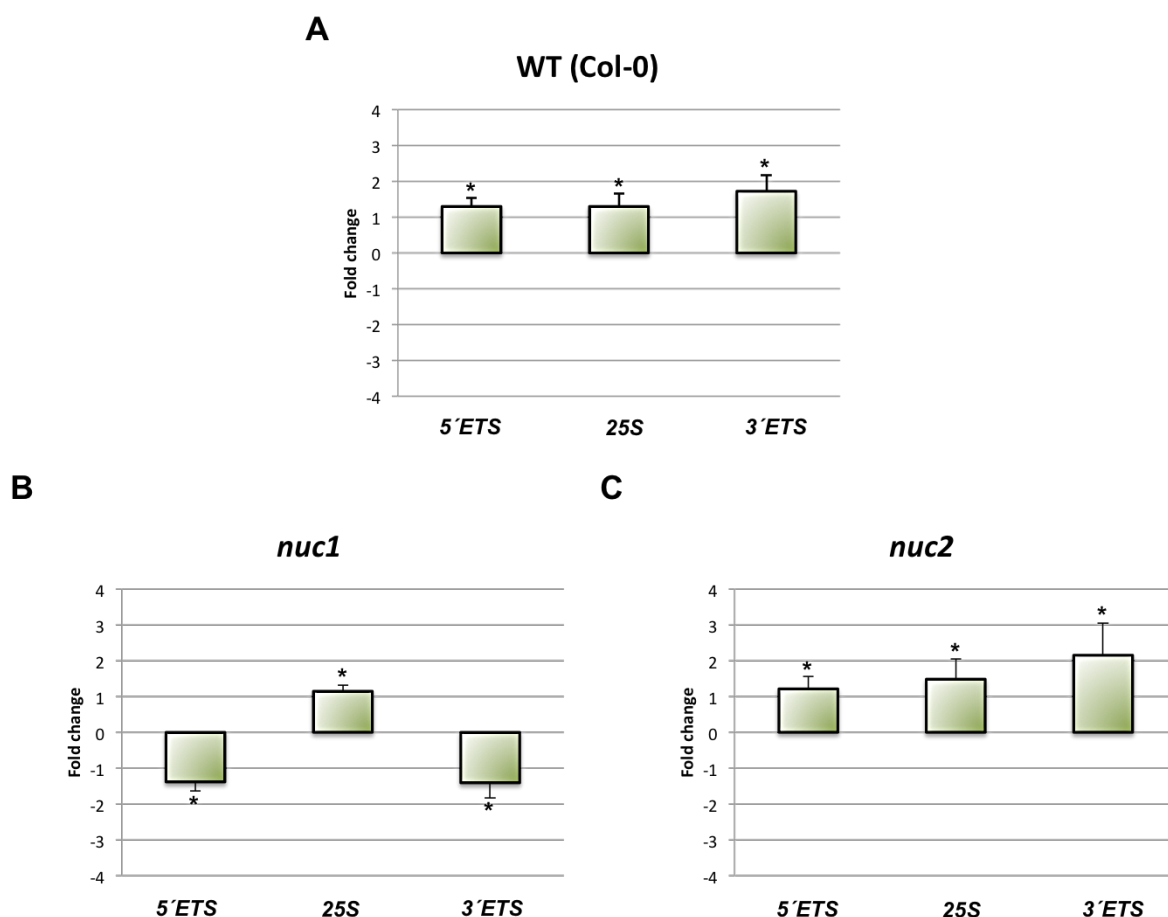
Este análisis se abordó de la misma forma que en el estudio anterior realizándose una electroforesis en gel de agarosa de RNA total, obteniéndose por densitometría una gráfica con picos de altura equivalente a la intensidad de la banda y calculando el ratio entre ellos (FIGURA 74A y 74B). Al igual que en el análisis anterior no se observó ninguna diferencia para ninguno de los tres genotipos analizados (Col-0, *nuc1* y *nuc2*) en condiciones de microgravedad simulada en comparación con el correspondiente control estático 1g fue obtenida (FIGURA 74C).



**Figura 74. Relación RNA 25S/18S presente en el RNA total de la parte aérea de plántulas de *Arabidopsis thaliana* crecidas durante 6 días en microgravedad simulada y fotoperiodo.** A) Fotografía del gel de agarosa tras la electroforesis del RNA total indicando cada condición experimental (Sim  $\mu g$  RPM y control estático 1g) y cada uno de los genotipos (*wild type*, *nuc1* y *nuc2*) utilizados en el experimento. B) Gráficas de la densitometría del gel de agarosa. C) Valor medio (3 réplicas biológicas) del ratio entre el RNA 25S y el RNA 18S en cada genotipo y condición.

#### 5.1.2.2. Biogénesis de ribosomas en la raíz

El procesamiento del transcrito primario pre-RNA 45S en la raíz fue analizado cuantificando la cantidad de RNA de cada uno de los extremos, 5'ETS y 3'ETS, y del RNA 25S por qRT-PCR. Los datos se interpretan de manera, que un mayor nivel cuantitativo de éstos está directamente relacionado con su mayor acumulación y por lo tanto, con un peor procesamiento y viceversa. El RNA 25S mostró una mayor acumulación bajo condiciones de microgravedad simulada en los tres genotipos (Col-0, *nuc1* y *nuc2*), mientras que ambos extremos (5'ETS y 3'ETS) presentaron una mayor acumulación en el genotipo silvestre y en el mutante *nuc2* y una menor acumulación en el mutante *nuc1* (FIGURA 75).



**Figura 75. Análisis del procesamiento del transcrito primario por qRT-PCR en raíces de plántulas de *Arabidopsis thaliana* crecidas durante 6 días en microgravedad simulada y régimen lumínico de fotoperiodo.** En la gráfica se representa la amplificación relativa de los extremos 5'ETS y 3'ETS y del RNA 25S en microgravedad simulada respecto de la condición control 1g. A) Línea silvestre Col-0, B) mutante para la proteína nucleolar, nucleolina 1 (*nuc1*) y C) mutante para la nucleolina 2 (*nuc2*).

\* Diferencias significativas respecto al control estático 1g ( $p < 0,05$  Test T-Student)

### 5.1.3. Estudio de la proliferación, crecimiento celular y transporte de auxinas en la raíz por técnicas de microscopía

#### 5.1.3.1. Proliferación celular: nº células/unidad de longitud (mm)

La proliferación celular se midió cuantificando el número de células por unidad de longitud (mm) en las filas de células que componen el meristemo radicular en un corte (z) central tomado en el microscopio láser confocal tras la tinción de la raíz con Reinassance (FIGURA 76A).

A los 6 días de crecimiento bajo un régimen de iluminación de fotoperiodo no se obtuvo ninguna diferencia en este parámetro entre las dos condiciones experimentales

(microgravedad simulada y control estático 1g) en ninguno de los genotipos, aunque se puede apreciar una pequeña disminución en el mutante *nuc2* sin llegar a ser estadísticamente significativa (FIGURA 76B).

### 5.1.3.2. Expresión del gen de la ciclina B1 mediante análisis histoquímico de la actividad $\beta$ -glucuronidasa (GUS)

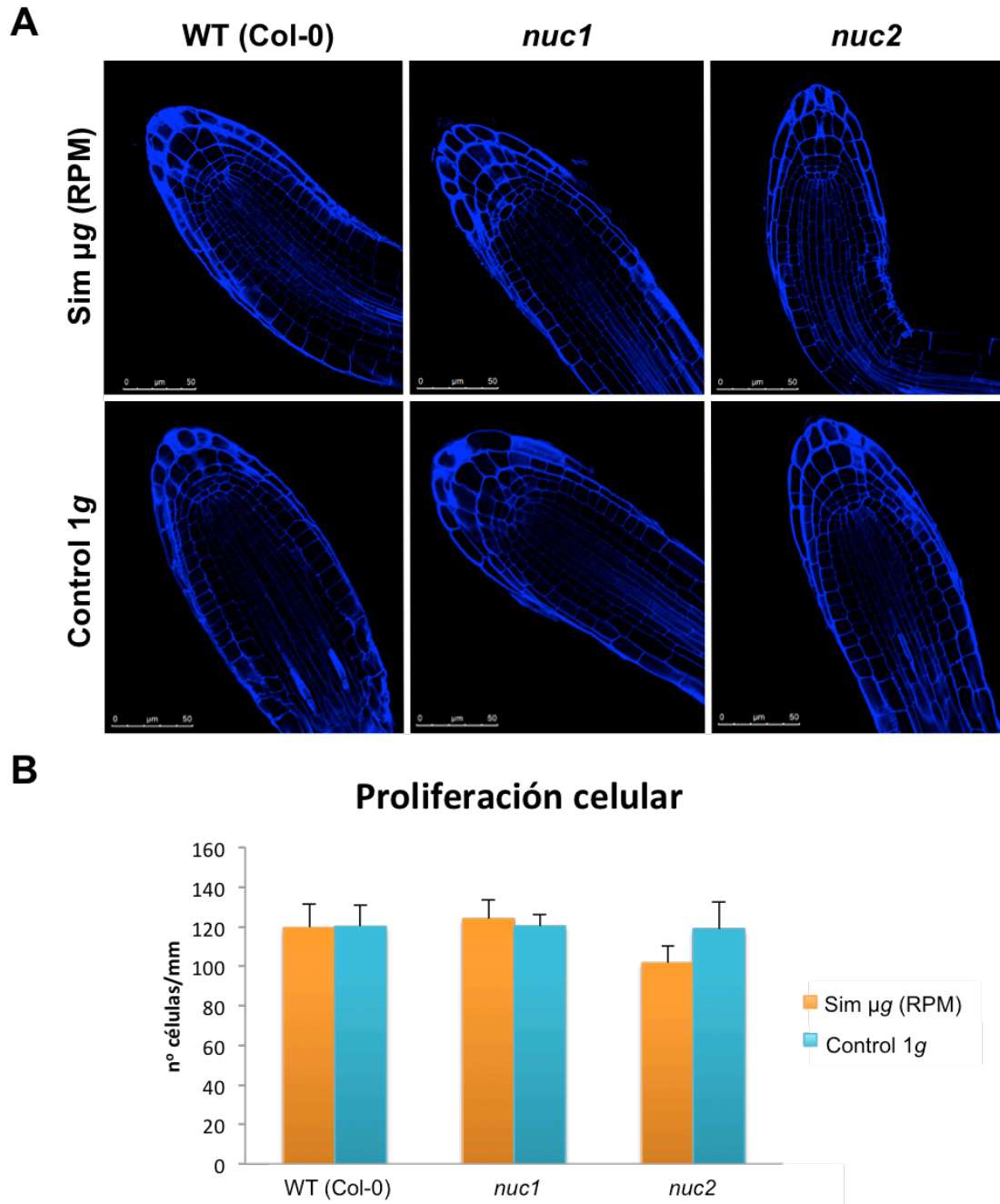
Utilizando el mismo abordaje empleado en el experimento de gravedad parcial realizado en las instalaciones de ESTEC, se detectó *in situ* la actividad del gen de la ciclina B1 en el meristemo radicular, utilizando la misma línea transgénica, y se evaluó cuantitativamente (D.O.I o Densidad Óptica Integrada) (FIGURA 77).

El resultado obtenido no mostró diferencias estadísticamente significativas entre las plantas crecidas en condiciones de microgravedad simulada y su correspondiente control estático 1g, aunque la expresión de este gen es menor en las condiciones control (FIGURA 77).

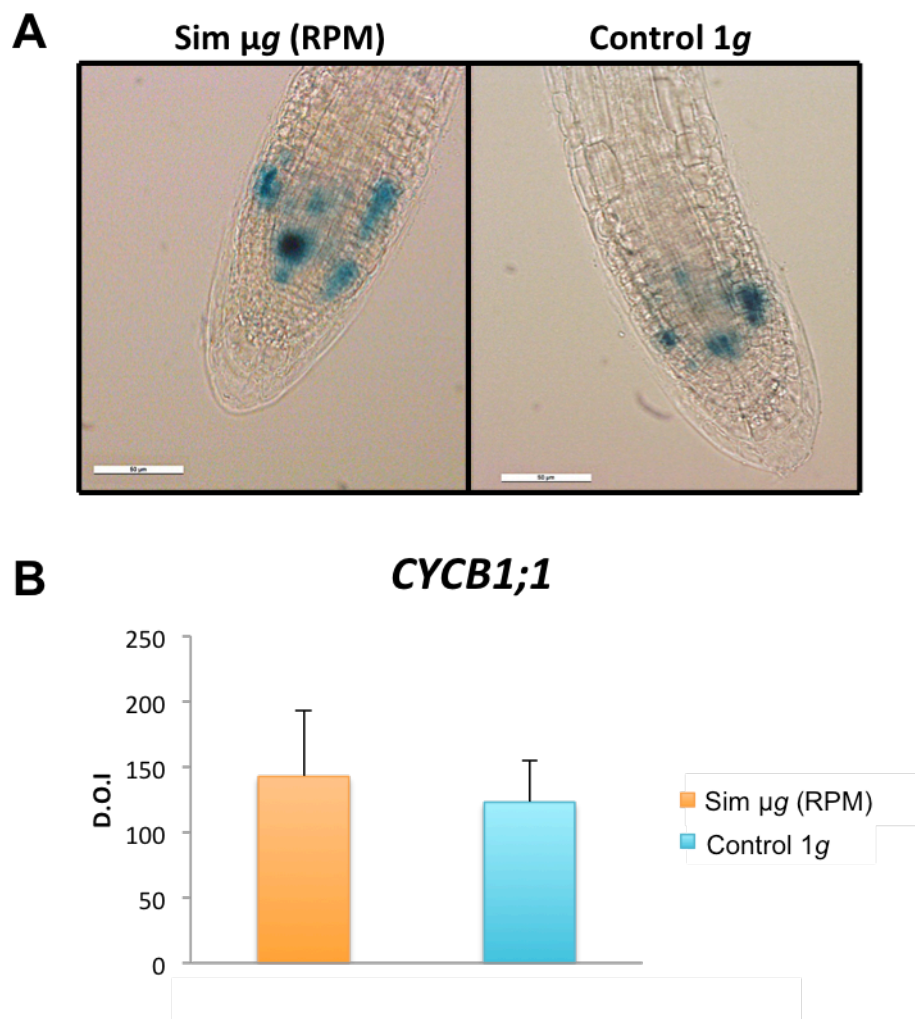
### 5.1.3.3. Crecimiento celular (Área del nucléolo, $\mu\text{m}^2$ )

El crecimiento celular fue analizado utilizando como marcador la cuantificación del área del nucléolo marcada por inmunofluorescencia anti-fibrilarina (proteína nucleolar). Esta cuantificación se realizó en los nucléolos de las filas que componen el meristemo radicular en un corte o z central observado en el microscopio láser confocal (FIGURA 78A).

El resultado de esta cuantificación para los tres genotipos utilizados en este experimento fue un área nucleolar muy similar entre condiciones de microgravedad y el control estático 1g no habiendo ninguna diferencia estadísticamente significativa en ninguno de los tres genotipos analizados (FIGURA 78B).

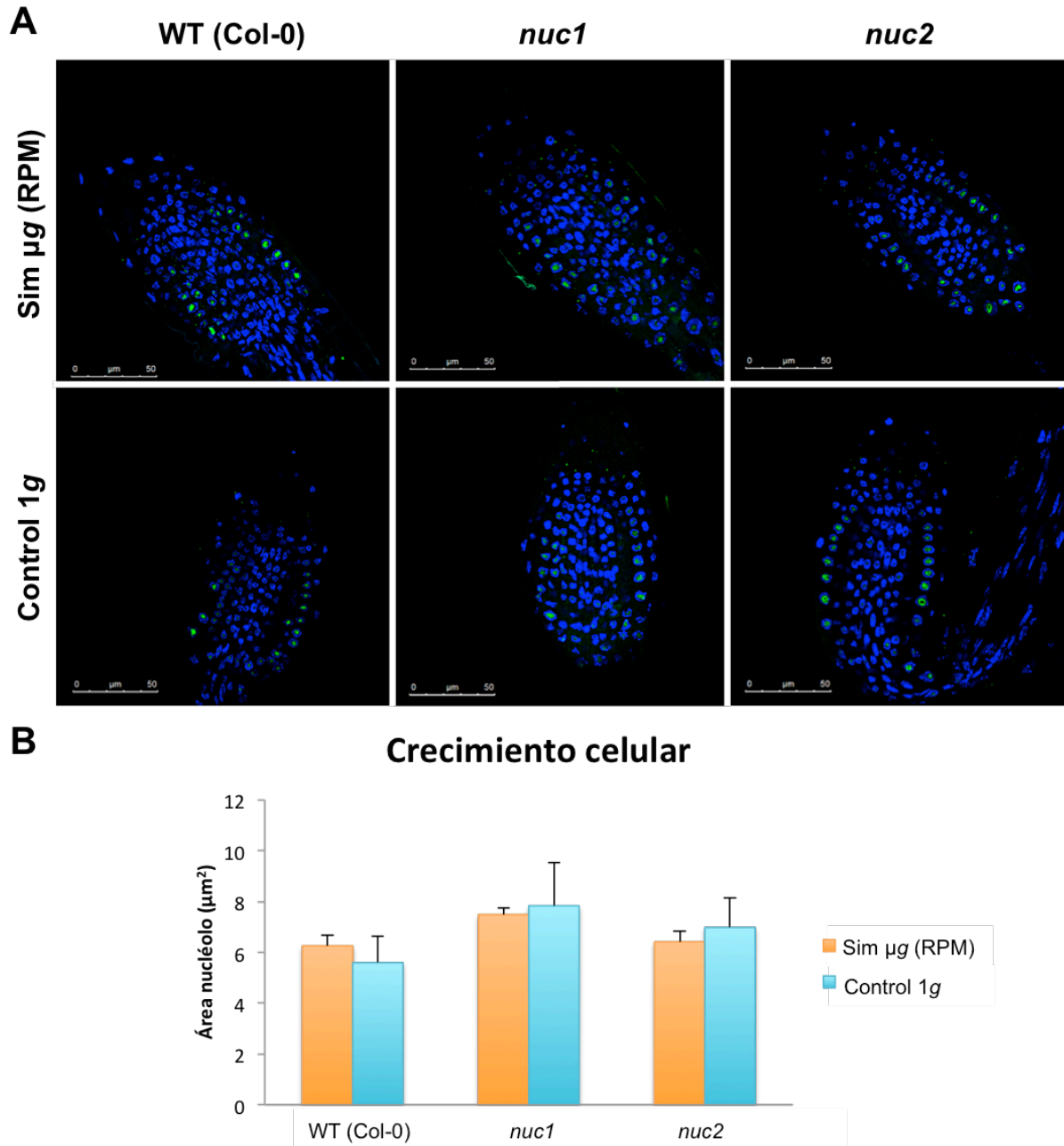


**Figura 76. Tasa local de proliferación celular en plántulas de *Arabidopsis thaliana* crecidas en condiciones de microgravedad simulada, en la RPM, durante 6 días.** A) Imágenes tomadas en el microscopio láser confocal, correspondiente a un corte o z central, de cada genotipo (Col-0, *nuc1* y *nuc2*) en cada condición experimental (Sim  $\mu g$  RPM y control estático 1g). Las barras indican 50  $\mu m$ . B) Cuantificación o tasa de producción local de producción celular (LCPR) media en condiciones de microgravedad simulada (naranja) y control (azul) en los genotipos wild type, *nuc1* y *nuc2*.



**Figura 77. Expresión del gen de la ciclina B1 en condiciones de microgravedad simulada y fotoperiodo durante 6 días.** A) Fotografías tomadas en el microscopio óptico en contraste de fases del meristemo radicular tras la tinción histológica GUS. Las barras indican 50  $\mu m$ . B) Cuantificación de la expresión de la ciclina B1 mostrándose el valor medio con su correspondiente desviación estándar.





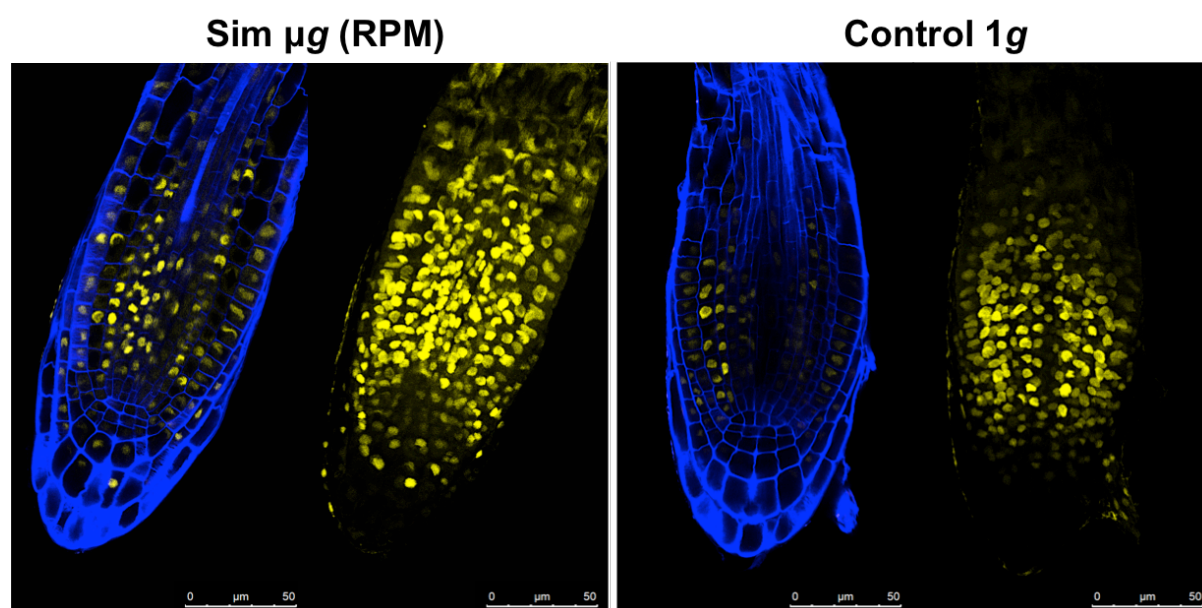
**Figura 78. Crecimiento celular en plántulas de *Arabidopsis thaliana* crecidas durante 6 días en condiciones de microgravedad simulada con un régimen lumínico de fotoperiodo.** A) Fotografías tomadas en el microscopio láser confocal para el genotipo silvestre y las líneas mutantes *nuc1* y *nuc2* en las condiciones de microgravedad simulada (Sim  $\mu g$  RPM) y control estático 1g. Se muestra un corte central para cada genotipo y condición correspondiéndose el color azul con la tinción del DNA con DAPI y el color verde a la señal de fluorescencia del anticuerpo anti-fibrilarina. Las barras indican 50  $\mu m$ . B) Valor medio del área nucleolar medido en el meristemo radicular con su correspondiente desviación estándar.



#### 5.1.3.4. Patrón de distribución de auxinas marcado por la línea transgénica DII-VENUS

La línea transgénica DII-VENUS fue utilizada para analizar la distribución de auxinas en el meristemo de la raíz en condiciones de microgravedad simulada, comparando el patrón obtenido en estas condiciones con el del control estático 1g.

Esta línea posee una construcción reportera de la ausencia de esta hormona, la cual permite relacionar la ausencia de señal de fluorescencia con la presencia de la hormona. En condiciones de microgravedad simulada (Sim  $\mu g$ , RPM) la señal de fluorescencia observada en el meristemo radicular es más intensa y se extiende por más zonas del meristemo, concretamente en las células de la columela, cuando lo comparamos con el patrón obtenido en condiciones control. Por otra parte, la alteración de la gravedad no induce ningún desequilibrio lateral (meristemo radicular) en la distribución de la hormona en la raíz (FIGURA 79).



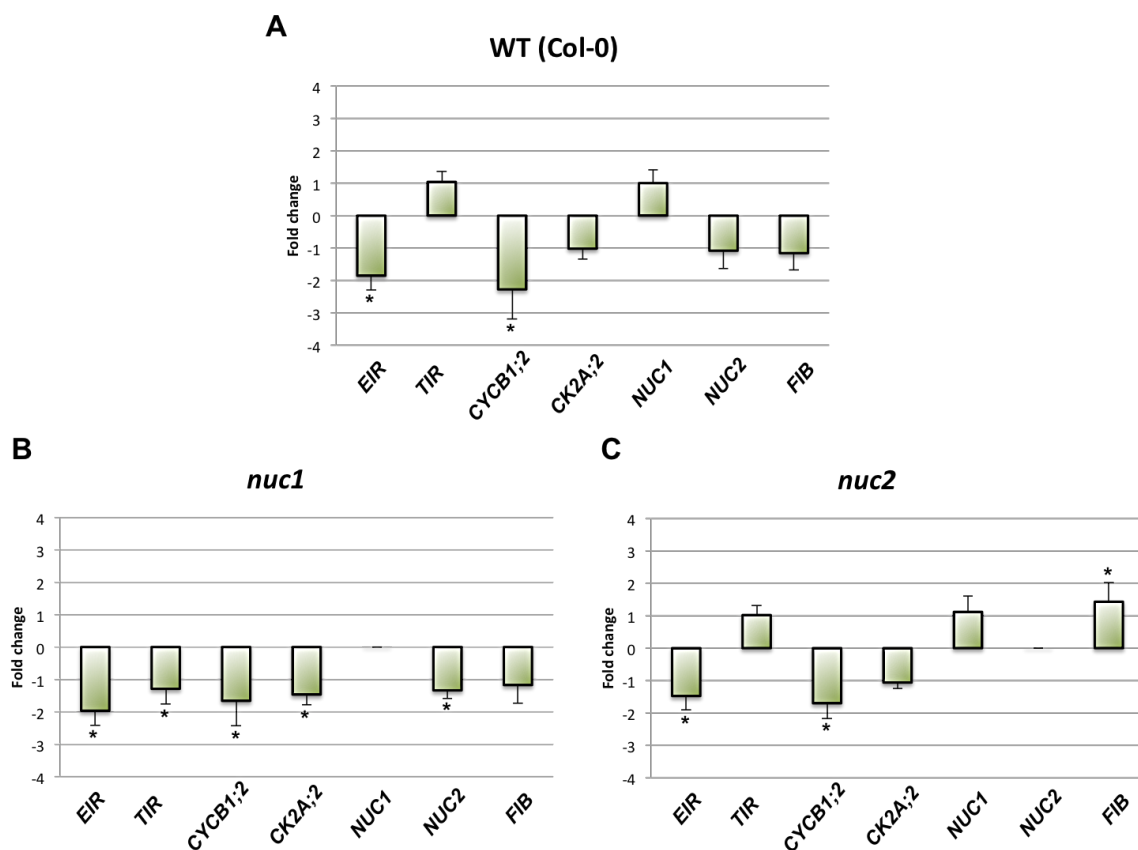
**Figura 79. Patrón de distribución de auxinas en plántulas de genotipo DII-VENUS crecidas en la RPM (Sim  $\mu g$  RPM) y en condiciones control (Control estático 1g) con fotoperiodo durante 6 días.** La señal amarilla de fluorescencia es debida a la expresión de la proteína YFP VENUS, en ausencia de auxina y en azul se muestran la membrana celular teñida con Reinassance. En cada condición estudiada, se muestra un corte o z central (izquierda) y la proyección máxima de la señal de fluorescencia amarilla (VENUS) (derecha).

#### 5.1.4. Estudio de la proliferación, crecimiento celular y transporte de auxinas en la raíz por técnicas de biología molecular

Además de analizar la proliferación, el crecimiento celular y la distribución de auxinas por técnicas de microscopía también se estudiaron estos procesos tan importantes para el desarrollo de la planta por *real-time* RT-PCR. En concreto, se han analizado genes tomados como marcadores de estos procesos, como son: *EIR* y *TIR* para el transporte de auxinas, *CYCB1;2* y *CK2A;2* como marcadores de proliferación celular y *NUC1*, *NUC2* y *FIB* para el estudio del crecimiento celular.

El transporte de auxinas se altera tanto en las plántulas silvestres Col-0, como en ambos mutantes, *nuc1* y *nuc2*, como muestra la disminución en la expresión del gen *EIR* en condiciones de microgravedad simulada. Además en el mutante *nuc1*, también se produce una marcada disminución del gen que codifica para el receptor de auxinas, *TIR*. En cuanto, a los genes marcadores de la proliferación celular, se obtuvo una marcada disminución del gen de la *CYCB1;2* (gen regulador de la transición G2/M), en la condición de microgravedad simulada, en los tres genotipos analizados. También se produjo una disminución estadísticamente significativa del marcador *CK2A;2* en el mutante *nuc1* (FIGURA 80).

Los marcadores de crecimiento celular afectados en su expresión en condiciones de microgravedad simulada en comparación con su correspondiente control estático 1g, fueron el gen de la nucleolina 2 (*NUC2*) en el mutante *nuc1* y el gen de la fibrilarina (*FIB*) en el mutante *nuc2*, no afectándose la expresión de ninguno de éstos marcadores en el genotipo silvestre (Col-0) (FIGURA 80).



**Figura 80. Expresión relativa de genes marcadores de proliferación celular, crecimiento celular y transporte de auxinas, en plántulas de *Arabidopsis thaliana* crecidas durante 6 días bajo condiciones de microgravedad simulada y régimen lumínico de fotoperiodo.** En la gráfica se representa la media del cambio de expresión (*Fold Change*) calculado en tres réplicas biológicas en condiciones de microgravedad simulada y el control estático 1g para los tres genotipos incluidos en el experimento, Col-0, *nuc1* y *nuc2*.

\* Diferencias significativas respecto al control estático 1g ( $p < 0,05$  Test T-Student) (*EIR*, *TIR*, *CYCB1;2* y *FIB*)

\* Diferencias significativas respecto al control estático 1g ( $p < 0,05$  Test U de Mann-Whitney-Wilcoxon) (*CK2A;2* y *NUC2*)

## 5.2. Estudios en condiciones de microgravedad simulada y oscuridad

En este experimento las plántulas de *Arabidopsis thaliana* (Col-0, *CYCB1;1:uidA*, DII-VENUS, *nuc1* y *nuc2*) germinadas y crecidas durante 6 días en el interior de la RPM (Sim  $\mu g$  RPM) o en posición estática vertical (control estático 1g) se mantuvieron en oscuridad (eliminando el fotoperiodo que se administró en el experimento anterior) para poder estudiar el efecto de la ausencia de gravedad en el crecimiento y desarrollo de las plantas, sin la presencia de ninguna otra señal trópica.

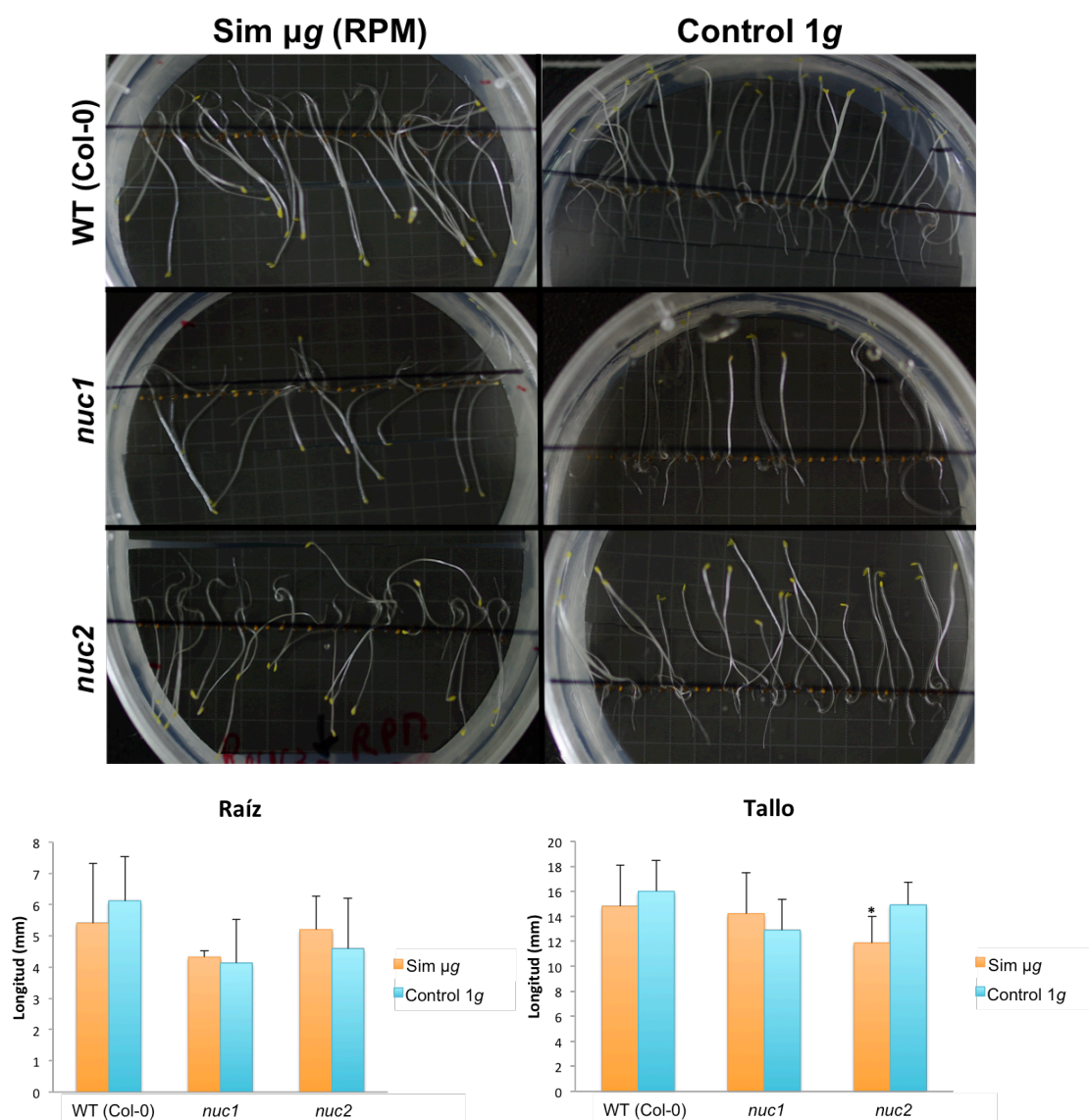
En este caso, se analizaron los mismos parámetros (proliferación, crecimiento celular, biogénesis de ribosomas y transporte de auxinas) en ambas partes de la planta, aérea (tallo) y subterránea (raíz) que en el experimento anterior (crecimiento en régimen lumínico de fotoperiodo).

### 5.2.1. Crecimiento y Longitud de tallo y raíz

Como se puede observar en las fotografías de las plántulas al finalizar el periodo de crecimiento (6 días), aquellas que crecieron en la condición control 1g presentaron una orientación, tanto de la parte aérea de la planta como de la raíz, acorde con lo esperado. Es decir, el tallo de las plantas crece en dirección opuesta al vector gravedad (gravitropismo negativo) y la raíz en la misma dirección de éste (gravitropismo positivo). En cambio, en la condición de microgravedad simulada, al no existir ningún estímulo trópico (ni luz ni gravedad), las plántulas muestran una total desorientación en la dirección de su crecimiento, muchas de ellas con raíces que crecen en dirección opuesta al vector gravedad y tallos que crecen a favor del vector gravedad.

La orientación en el crecimiento observada fue similar en los tres genotipos incluidos en el experimento: *Col-0*, *nuc1* y *nuc2* (FIGURA 81).

En cuanto a la longitud de ambas partes de la planta, en la raíz no detectamos ningún cambio en su crecimiento entre las dos condiciones experimentales analizadas, para ninguno de los tres genotipos estudiados. En cambio, la longitud del tallo en las plántulas mutantes *nuc2*, fue menor en condiciones de microgravedad simulada respecto de su control 1g. Esta diferencia en la longitud del tallo no se observa para los otros dos genotipos, *Col-0* y *nuc1* (FIGURA 81).



**Figura 81. Orientación de crecimiento y longitud de tallo y raíz en plántulas de *Arabidopsis thaliana* germinadas y crecidas en condiciones de microgravedad simulada y oscuridad.** En la parte superior se muestran fotografías de las placas después de los 6 días de crecimiento en microgravedad simulada y su correspondiente control 1g, para cada uno de los tres genotipos estudiados (Col-0, *nuc1* y *nuc2*). En la parte inferior se representa la cuantificación (valor medio) de la longitud de tallo y raíz en las condiciones experimentales.

\* Diferencias significativas respecto al control estático 1g ( $p < 0,05$  Test T-Student)

## 5.2.2. Estudio de la biogénesis de ribosomas

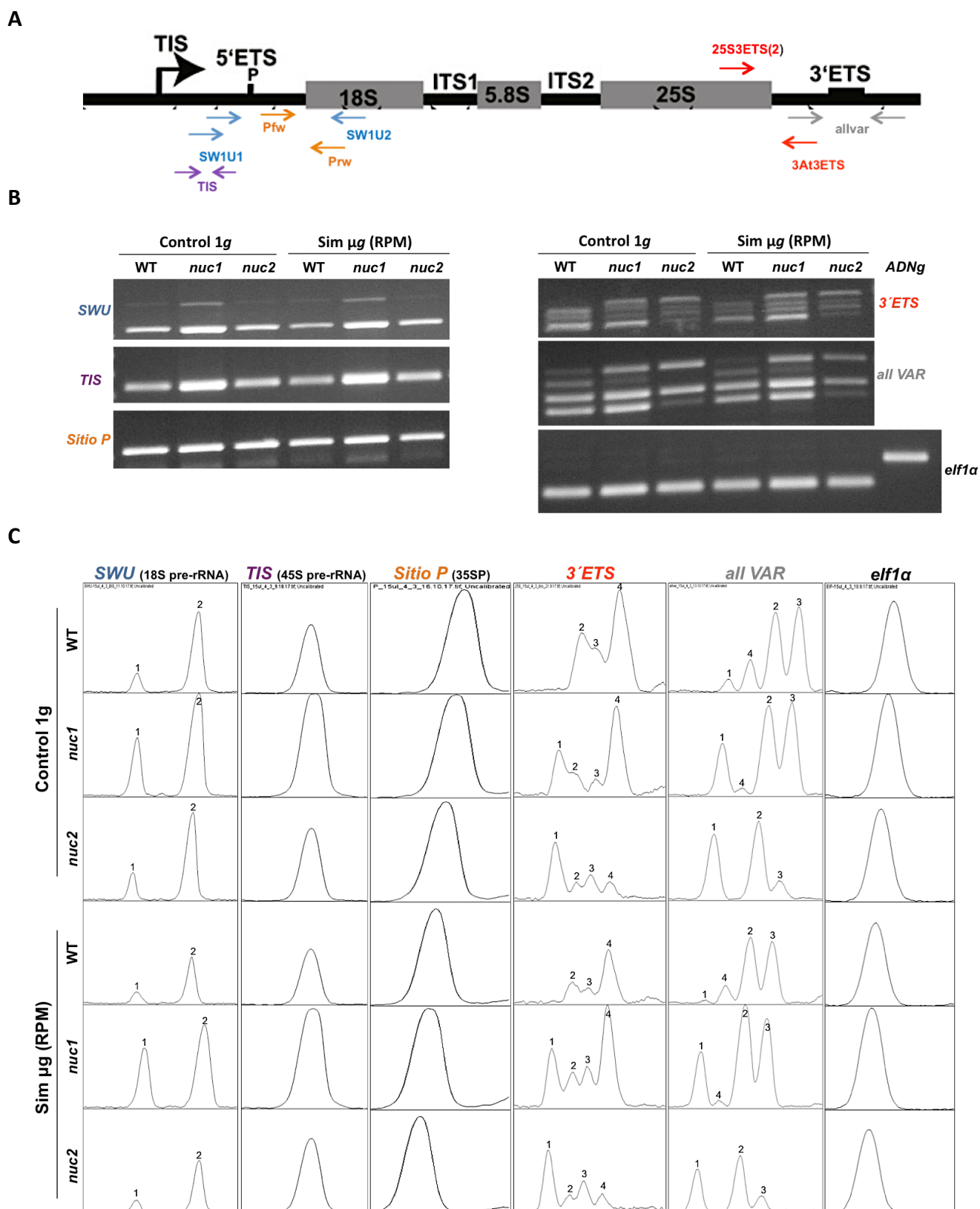
### 5.2.2.1. Biogénesis de ribosomas en la parte aérea (tallo)

El proceso de biogénesis de ribosomas fue estudiado analizando el procesamiento del pre-RNA 45S (transcripto primario) en sus extremos 5'ETS y 3'ETS, utilizando distintas parejas de cebadores, por RT-PCR convencional (FIGURA 82A).

El patrón de bandas obtenido tras la electroforesis en gel de agarosa para la parejas de cebadores del extremo 3'ETS (*3'ETS* y *all VAR*) en la condición control es diferente en los dos mutantes de nucleolina (*nuc1* y *nuc2*) en comparación con el genotipo silvestre (Col-0), pero cuando comparamos el patrón de bandas de cada genotipo entre las dos condiciones experimentales, y conocer el efecto de la microgravedad en este proceso, no se obtuvo ninguna diferencia.

El patrón de bandas obtenido con las parejas de *primers* del extremo 5'ETS (*SWU*, *TIS* y *Sitio P*) no es diferente ni entre genotipos en la condición control 1g, ni entre las dos condiciones experimentales (Sim  $\mu$ g RPM y control estático 1g) para cada uno de los tres genotipos (FIGURA 82B).

Cuando se calculó la relación entre amplicones (comparando la altura de cada pico proporcional a la intensidad de la banda del gel de agarosa) como en el experimento con fotoperiodo (FIGURA 82C), no se obtuvo ninguna diferencia significativa en este parámetro al comparar el resultado obtenido en microgravedad simulada con la condición control 1g para ninguna pareja de cebadores y para ninguno de los tres genotipos (FIGURA 83).



**Figura 82. Análisis de la biogénesis de ribosomas en plántulas de *Arabidopsis thaliana* expuestas durante todo su periodo de crecimiento (6 días) a microgravedad simulada en la RPM y oscuridad. A) Esquema del primer transcritpo por la RNA pol I o pre-rRNA 45S mostrando la localización de anillamiento de cada pareja de cebadores (3'ETS, all VAR, SWU, TIS, Sitio P) utilizados para analizar el procesamiento de este transcritpo. B) Productos de amplificación obtenidos tras la electroforesis del producto de PCR en gel de agarosa para cada una de las parejas de primers y cada genotipo (Col-0, nuc1 y nuc2) en microgravedad simulada (Sim µg RPM) y en la condición control 1g. C) Picos obtenidos tras el análisis informático de los geles de agarosa correspondiéndose la altura del pico con la intensidad lumínica de cada banda.**



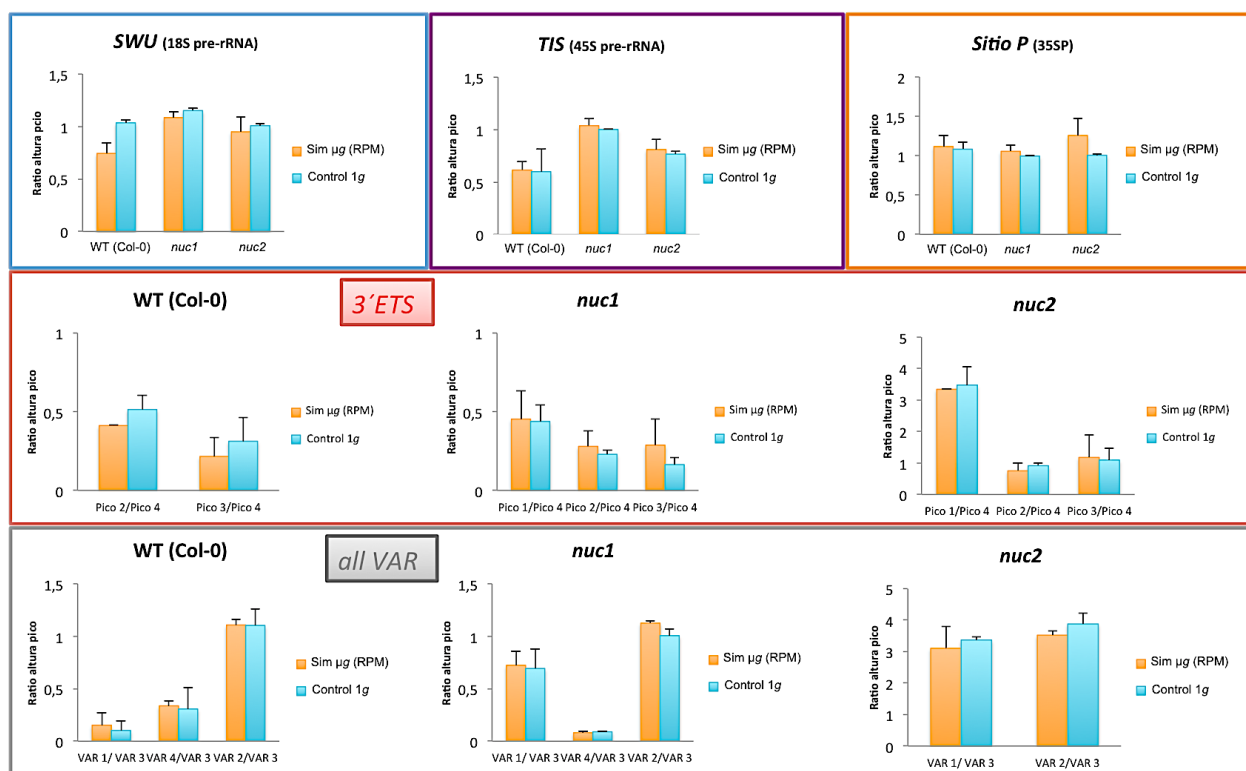
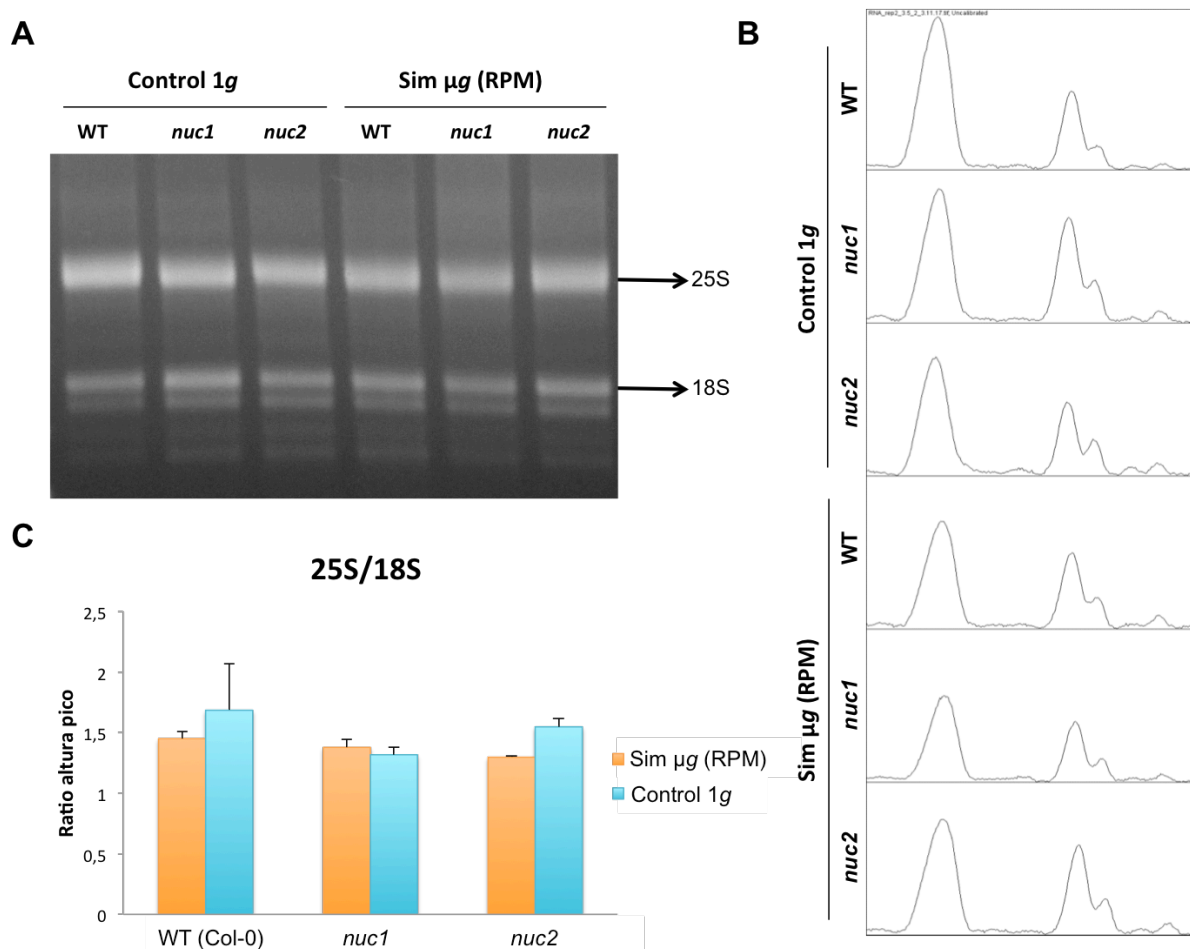


Figura 83. Cuantificación del ratio de altura mostrando el valor medio (3 réplicas biológicas) con su correspondiente desviación estándar para cada una de las parejas de cebadores en los tres genotipos (Col-0, nuc1 y nuc2) y ambas condiciones experimentales (Sim µg RPM y control 1g).

El análisis de la relación de RNA 25S/18S existente en el RNA total extraído de la parte aérea de la planta (tallo) se llevo a cabo siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Es decir, el RNA total fue separado en sus correspondientes componentes en función de su tamaño (pb) por electroforesis en gel de agarosa (FIGURA 84A), éste fue sometido a una análisis informático para la obtención de los correspondientes picos en proporción con la intensidad de la banda (FIGURA 84B) y se calculó la relación entre la altura del pico correspondiente al RNA 25S y el correspondiente al RNA 18S (FIGURA 84C). Como se muestra en la gráfica, el valor medio de ratio obtenido de las tres réplicas biológicas realizadas fue muy similar en los tres genotipos incluidos en este experimento (Col-0, nuc1 y nuc2) entre las condiciones de microgravedad simulada y el control 1g, no existiendo ninguna diferencia significativa (FIGURA 84C).

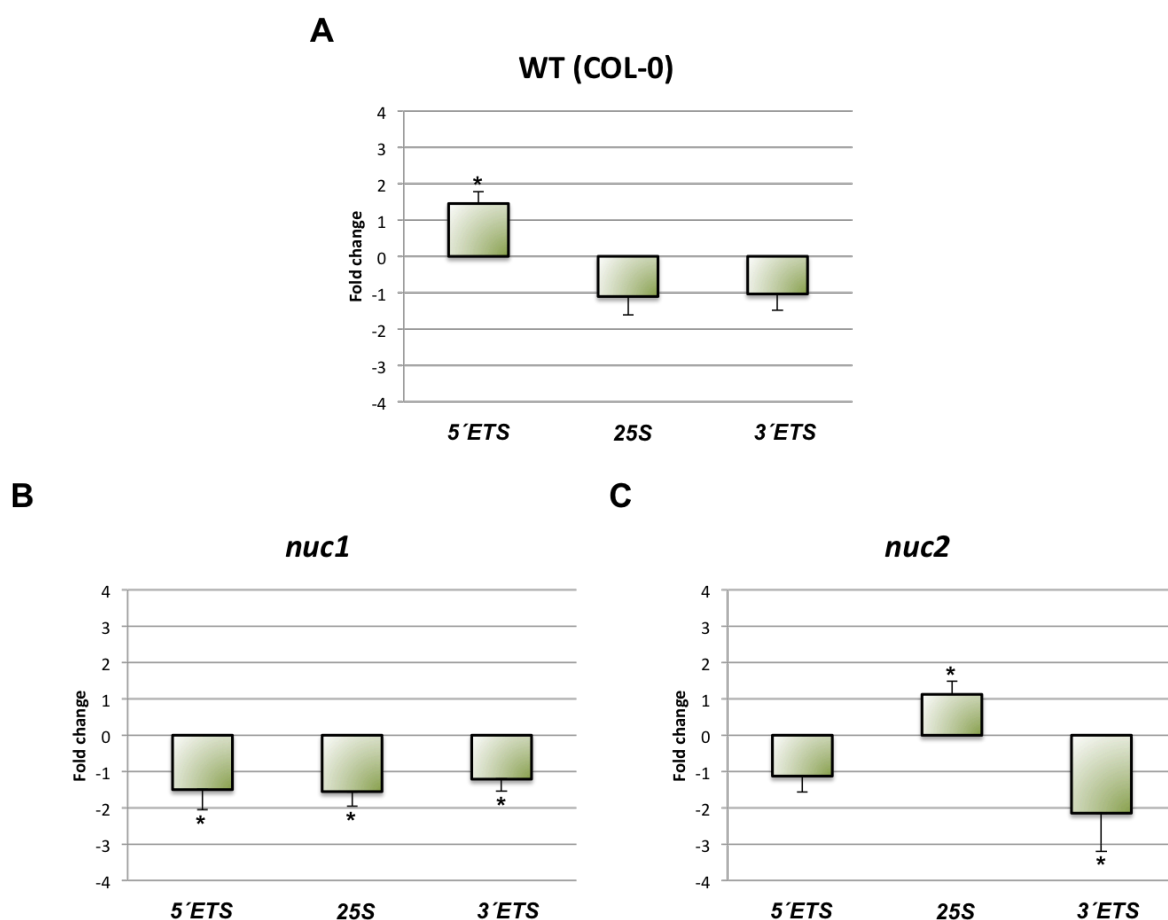




**Figura 84. Relación entre RNA 25S/18S presente en los tallos de plántulas de *Arabidopsis thaliana* crecidas durante 6 días en oscuridad en la RPM (Sim  $\mu$ g).** A) Bandas correspondiente a los distintos RNAs presentes en el RNA total de plantas tras su correspondiente electroforesis señalando con una flecha la banda correspondientes al RNA 25S y al RNA 18S. B) Gráficas con los distintos picos correspondiente a las bandas del gel obtenidas por análisis informático. C) Valor medio (3 réplicas biológicas) de la relación de picos o cantidad de 25S respecto a la cantidad de 18S para los tres genotipos estudiados (Col-0, *nuc1* y *nuc2*) en ambas condiciones experimentales (Sim  $\mu$ g y control 1g).

#### 5.2.2.2. Biogénesis de ribosomas en la raíz

El procesamiento del pre-RNA 45S sufrió alteraciones en los niveles de acumulación del RNA 25S y en sus extremos 5'ETS y 3'ETS en las raíces de plantas crecidas en microgravedad simulada y ausencia de luz. En concreto, en las condiciones indicadas y según resultados de qRT-PCR, la acumulación del extremo 5'ETS fue mayor en el genotipo *wild type* y menor en el mutante *nuc1*. El RNA 25S se acumuló más significativamente en el mutante *nuc2*, pero menos en el mutante *nuc1*. El extremo 3'ETS sufrió una menor acumulación en las dos líneas mutantes (*nuc1* y *nuc2*) al comparar con los niveles obtenidos para cada uno de sus correspondientes controles (FIGURA 85).



**Figura 85.** Estudios del procesamiento del pre-rRNA cuantificando la acumulación de los extremos 5'ETS y 3'ETS y del RNA 25S, mediante qRT-PCR, en raíces de las tres líneas de plántulas A) Col-0, B) *nuc1* y C) *nuc2*) sometidas a microgravedad en ausencia de luz durante 6 días. En la gráfica se representa la amplificación relativa en microgravedad simulada respecto de la condición control 1g.

Diferencias significativas respecto al control estático 1g ( $p < 0,05$  Test T-Student)

### 5.2.3. Estudio de la proliferación, crecimiento celular y transporte de auxinas en la raíz por técnicas de microscopía

#### 5.2.3.1. Proliferación celular: nº células/unidad de longitud (mm)

La tasa local de producción celular (LCPR) o lo que es lo mismo el número de células por unidad de longitud se calculó en el meristemo radicular (filas de células que conforman el cilindro cortical) como un parámetro indicador de la proliferación celular, tras la tinción de la raíces *in toto* con Reinassance (FIGURA 86A).

Este parámetro fue levemente menor en las plantas de los genotipos Col-0 y *nuc2* germinadas en microgravedad simulada respecto a su correspondiente control 1g. En

las plantas mutantes *nuc1*, se produjo una disminución significativa en el nº células/mm del meristemo radicular en microgravedad simulada (Sim  $\mu g$ ) respecto al control estático 1g (FIGURA 86B).

### 5.2.3.2. Expresión del gen de la ciclina B1 mediante análisis histoquímico de la actividad $\beta$ -glucuronidasa (GUS)

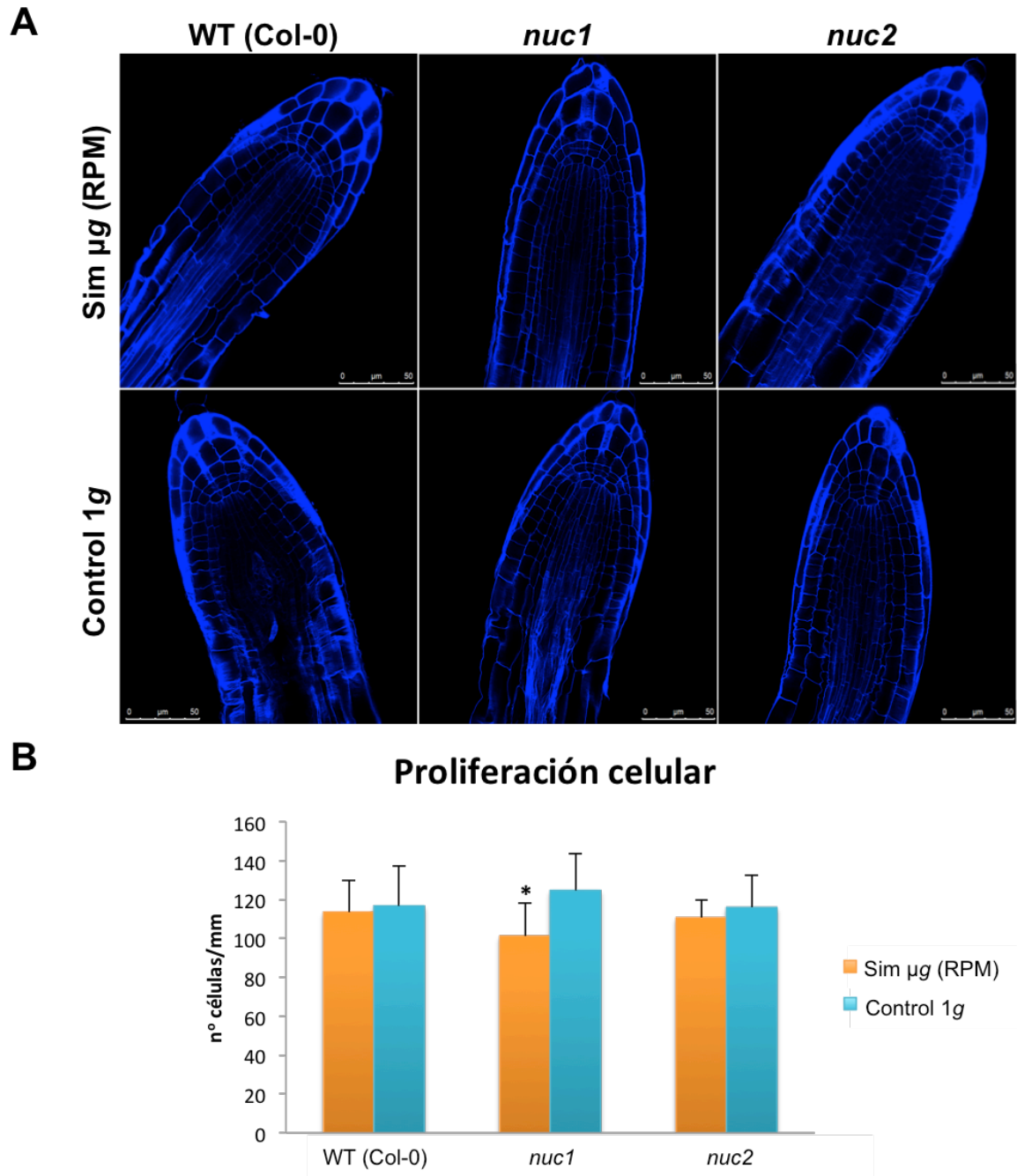
La expresión del gen de la ciclina B1, como indicador de proliferación celular por su papel regulador en la transición G2/M del ciclo celular, fue estudiado *in situ* y cuantificado (Densidad Óptica Integrada, D.O.I) en los meristemos radiculares de la línea transgénica de *Arabidopsis thaliana*, *CYCB1;1:uidA*, crecida en microgravedad simulada y oscuridad (FIGURA 87A).

La expresión de este gen fue mayor en la plántulas que crecieron en el interior de la RPM (microgravedad simulada, Sim  $\mu g$ ) cuando las comparamos con las crecidas en posición estática vertical (control 1g), pero sin llegar a ser estadísticamente significativa (FIGURA 87B).

### 5.2.3.3. Crecimiento celular (Área del nucléolo, $\mu m^2$ )

La cuantificación del área marcada por la señal de fluorescencia resultado de la inmunofluorescencia con anticuerpo anti-fibrilarina, en las células de las capas del meristemo radicular de un corte central fue determinada como un parámetro indirecto del crecimiento celular (FIGURA 88A).

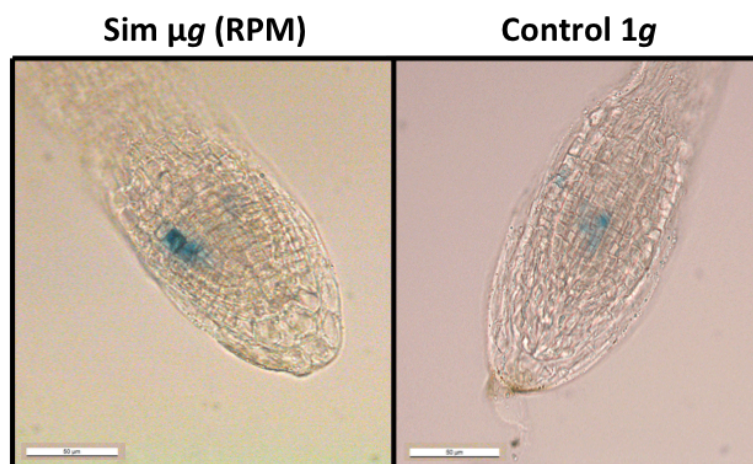
El área obtenida en la condición de microgravedad simulada (Sim  $\mu g$  RPM) en las dos líneas mutantes, *nuc1* y *nuc2*, fue menor en comparación con su correspondiente control 1g. En el genotipo silvestre (Col-0), este parámetro también disminuye pero sin que la diferencia llegue a ser estadísticamente significativa (FIGURA 88B).



**Figura 86. Proliferación celular bajo microgravedad simulada y oscuridad durante 6 días en tres líneas de plantas de *Arabidopsis thaliana*.** A) Fotografías de un corte central de la punta de la raíz tomadas en el microscopio láser confocal tras su tinción con Reinassance. Se muestra un ejemplo para cada línea (Col-0, *nuc1* y *nuc2*) para ambas condiciones ensayadas (Sim  $\mu g$  y control 1g). Las barras indican 50  $\mu m$ . B) Valor medio del n° células/mm en el meristemo radicular para cada una de las tres líneas y cada condición de crecimiento estudiada.

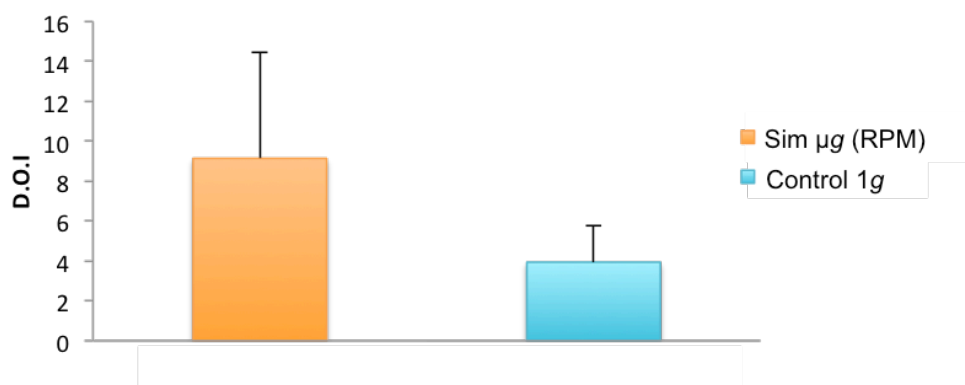
\* Diferencias significativas respecto al control estático 1g ( $p < 0,05$  Test T-Student)

**A**

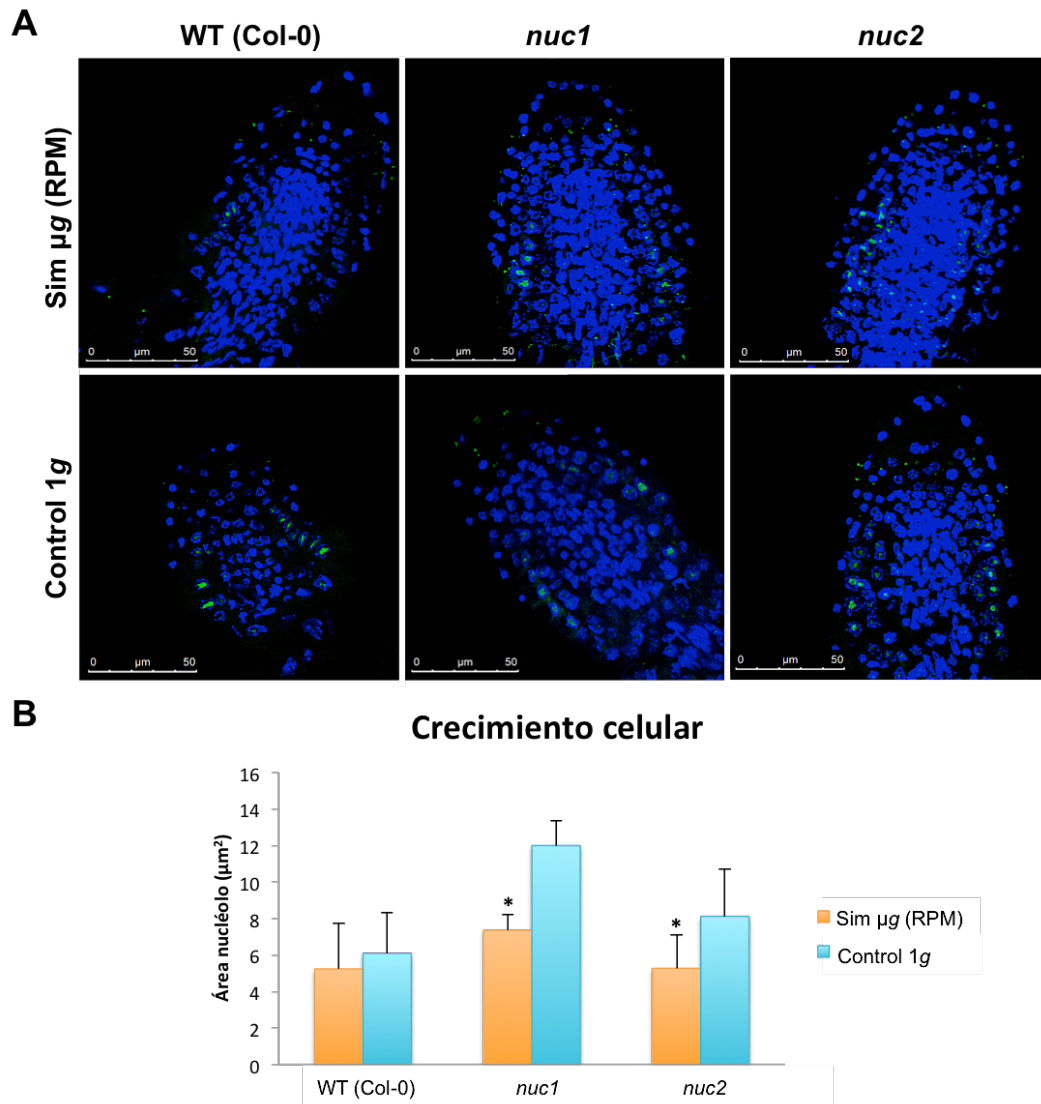


**B**

***CYCB1;1***



**Figura 87. Expresión del gen de la ciclina B1 bajo condiciones de microgravedad simulada y oscuridad durante 6 días.** A) Fotografías tomadas en el microscopio óptico en contraste de fases del meristemo radicular tras la tinción histológica GUS en microgravedad simulada (Sim  $\mu g$ ) y en condiciones control 1g. Las barras indican 50  $\mu m$ . B) Cuantificación de la expresión de la ciclina B1 mostrándose el valor medio con su correspondiente desviación estándar.



**Figura 88. Crecimiento celular tras el crecimiento de plántulas de *Arabidopsis thaliana* en microgravedad simulada y oscuridad.** A) Fotografías de un corte o z central del meristemos radicular de las tres líneas utilizadas (Col-0, *nuc1* y *nuc2*) en cada condición experimental (Sim  $\mu g$ ) tras la realización de inmunofluorescencia anti-fibrilarina. En azul se muestra la tinción del DNA nuclear con DAPI y en verde la señal de fluorescencia correspondiente a esta proteína. Las barras indican 50  $\mu m$ . B) Valor medio del área nucleolar ( $\mu m^2$ ) para cada genotipo y condición experimental. \* Diferencias significativas respecto al control estático 1g ( $p < 0,05$  Test T-Student)

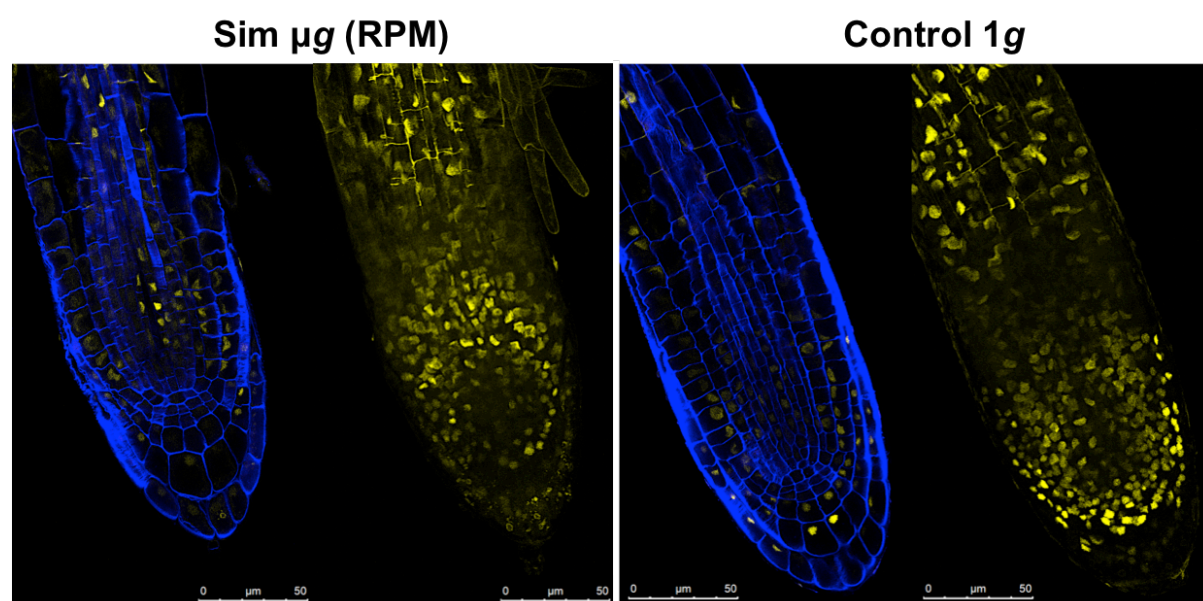


#### 5.2.3.4. Patrón de distribución de auxinas marcado por la línea transgénica DII-VENUS

La línea transgénica DII-VENUS se incluyó en el experimento para estudiar el efecto de la falta de gravedad sin presencia de ningún estímulo trópico en el transporte y distribución de auxinas en el meristemo de la raíz.

La intensidad de la señal de fluorescencia observada en esta línea es inversamente proporcional a la presencia de esta fitohormona, al poseer una construcción génica que está en fase con el dominio DII de la proteína Aux/IAA y cuya degradación está catalizada por el complejo de ubiquitinación SCF<sup>TIR/AFB1-5</sup> en presencia de auxina.

Como se puede observar en las fotografías tomadas en el microscopio láser confocal el patrón de fluorescencia obtenido en microgravedad simulada y oscuridad mostró una menor intensidad en la señal tanto en las células de las capas del meristemo, cilindro central y columela, indicando que esta falta de gravedad altera la distribución de auxinas en esta parte de la planta, acumulándose más auxina y por tanto, afectándose o inhibiéndose el transporte de esta hormona (FIGURA 89).



**Figura 89. Patrón de distribución de auxinas en plántulas de genotipo DII-VENUS crecidas durante 6 días en microgravedad simulada y oscuridad.** La señal fluorescente azul destaca las membranas celulares tras su tinción con Reinassance y la señal amarilla de fluorescencia se corresponde con la señal de la proteína YFP VENUS. Un corte central del meristemo radicular (izquierda) y la proyección máxima de la señal amarilla de fluorescencia (derecha) se presenta en cada una de las condiciones experimentales.

#### 5.2.4. Estudio de la proliferación, crecimiento celular y transporte de auxinas en la raíz por técnicas de biología molecular

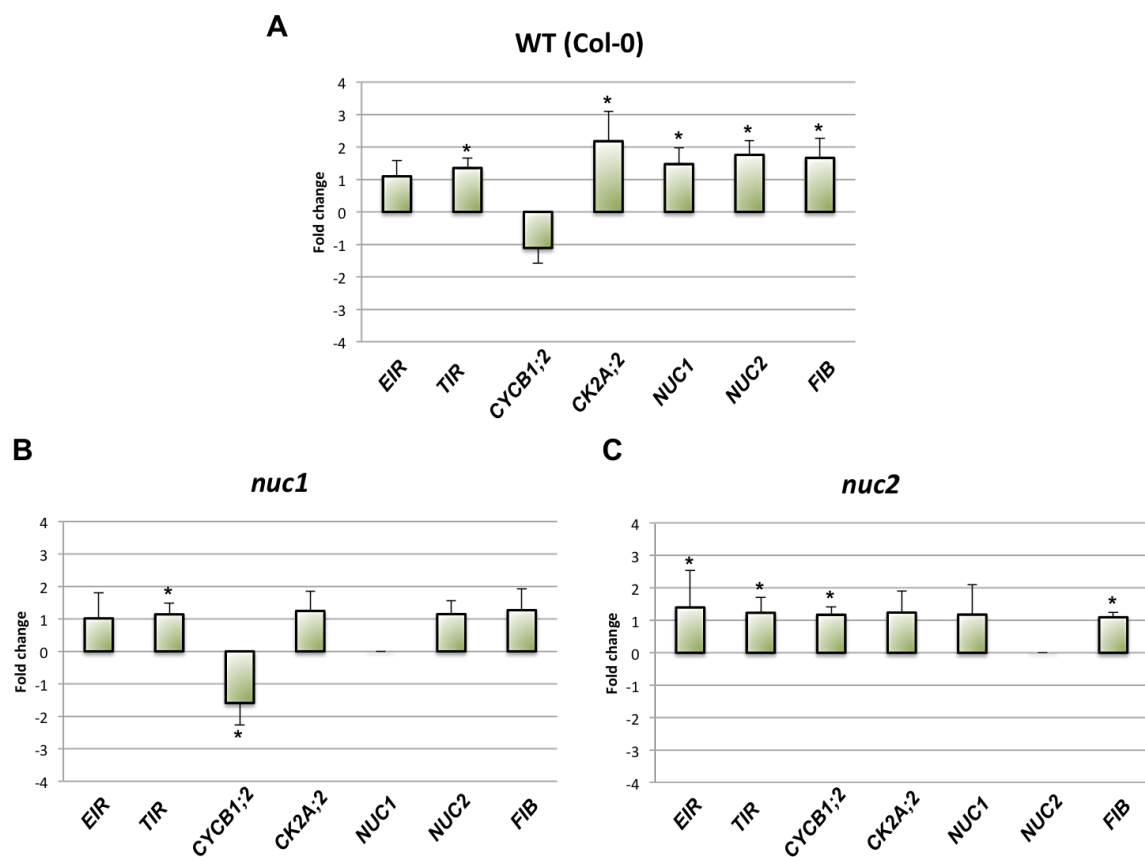
Los procesos de proliferación, crecimiento celular y distribución de auxinas fueron también analizados mediante el estudio de la expresión de genes marcadores de estos procesos por *real-time* RT-PCR: *EIR* y *TIR* elegidos para el transporte de auxinas, *CYCB1;2* y *CK2A;2* como marcadores de proliferación celular y *NUC1*, *NUC2* y *FIB* para el estudio del crecimiento celular.

La percepción de auxinas se vio afectada en microgravedad simulada y oscuridad al producirse un aumento de la expresión del gen *TIR* en los tres genotipos incluidos en el estudio (*Col-0*, *nuc1* y *nuc2*). El transporte de auxinas mostró un aumento en la expresión del gen tomado como marcador, *EIR*, solo en las plántulas del genotipo mutante *nuc2* en esas mismas condiciones (FIGURA 90).

En cuanto, a la proliferación celular, el gen de la *CYCB1;2* sufrió una disminución significativa en su expresión en la línea mutante *nuc1* y un aumento en la línea mutante *nuc2*, al compararlo con la expresión de este gen en las condiciones control (1g). En cambio, el gen *CK2A;2* vio aumentada su expresión respecto al control 1g únicamente en el genotipo silvestre (*Col-0*).

En los tres genes marcadores del crecimiento celular (*NUC1*, *NUC2* Y *FIB*) se produjo un aumento en su expresión en ausencia de gravedad y oscuridad en el genotipo *Col-0* en comparación con la condición control o el nivel de gravedad presente en la superficie de la Tierra. En el caso de las líneas mutantes de nucleolina, solo las plántulas mutantes *nuc2* presentaron un aumento de expresión en el gen que codifica para la fibrilarina (*FIB*) (FIGURA 90).





**Figura 90. Expresión relativa de genes marcadores de proliferación celular, crecimiento celular, biogénesis de ribosomas y transporte de auxinas, en plántulas de *Arabidopsis thaliana* crecidas durante 6 días bajo condiciones de microgravedad simulada y oscuridad.** En la gráfica se representa el valor medio del fold change entre condiciones de microgravedad simulada y el control estático 1g para los tres genotipos incluidos en el experimento, Col-0, *nuc1* y *nuc2*.

\* Diferencias significativas respecto al control estático 1g ( $p < 0,05$  Test T-Student) (*EIR*, *TIR*, *NUC1*, *FIB*, *5'ETS*, *25S* y *3'ETS*)

\* Diferencias significativas respecto al control estático 1g ( $p < 0,05$  Test U de Mann-Whitney-Wilcoxon) (*CYCB1;2*, *CK2A;2* y *NUC2*)

### 5.3. Resumen del efecto de la microgravedad simulada en la proliferación y el crecimiento celular en distintos regímenes de iluminación, fotoperiodo y oscuridad

En la siguiente tabla (TABLA 22) se recogen las alteraciones, en todos los parámetros estudiados y en todos los genotipos incluidos en los experimentos en ausencia de gravedad (Sim  $\mu g$  RPM) con dos regímenes lumínicos distintos durante todo el periodo de crecimiento (6días) de las plántulas: fotoperiodo (16h luz blanca/8h oscuridad) u oscuridad.

Efecto de la microgravedad (fotoperiodo y oscuridad)						
		Régimen lumínico				
		Fotoperiodo			Oscuridad	
Línea (genotipo)		WT	<i>nuc1</i>	<i>nuc2</i>	WT	<i>nuc1</i> <i>nuc2</i>
Longitud (mm)	Raíz	= (-)	= (-)	-	=	=
	Tallo	=	=	=	=	=
Biogénesis ribosomas	RT-PCR (tallos)	=	=	=	=	=
	25S/18S (tallos)	=	=	=	=	=
	qRT-PCR (raíz)					
	5'ETS	+	-	+	+	-
	25S	+	+	+	=	+
Raíz	Microscopia	3'ETS	+	-	+	-
		Proliferación celular (nº células/mm)	=	=	= (-)	= (-)
		Expresión <i>CYCB1;1</i> (D.O.I)	=		= (+)	
		Crecimiento celular (área nucleólo, $\mu m^2$ )	=	=	=	=
	Biología molecular	Distribución auxinas (DII-VENUS)	No Alterado		Alterado	
		Auxinas <i>EIR</i>	-	-	-	+
		<i>TIR</i>	=	-	+	+
		Proliferación <i>CYCB1;2</i>	-	-	-	+
		<i>CK2A;2</i>	=	-	=	=
		<i>NUC1</i>	=		+	=
		Crecimiento <i>NUC2</i>	=	-	+	=
		<i>FIB</i>	=	=	+	+

Tabla 22. Resumen del efecto de la microgravedad simulada (Sim  $\mu g$  RPM) y dos regímenes distintos de iluminación (fotoperiodo y oscuridad) en la proliferación y crecimiento celular de distintas líneas de plántulas de *Arabidopsis thaliana* (Col-0, *nuc1*, *nuc2*, *CYCB1;1:uidA* y DII-VENUS) que crecieron durante 6 días en estas condiciones. Los parámetros analizados que mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto del control estático 1g se indican con los signos + o - dependiendo si sufre un aumento o una disminución, respectivamente. Aquellos parámetros que no cambian al comparar ambas condiciones experimentales se indican con el signo = incluyendo entre paréntesis la tendencia de su variación (+ o -).

## 5.4. Estudios en condiciones de microgravedad y radiación bajo los dos regímenes de iluminación, fotoperiodo y oscuridad

Además de los dos experimentos descritos anteriormente para estudiar el efecto de la microgravedad en la proliferación y crecimiento celular bajo dos regímenes distintos de iluminación, fotoperiodo y oscuridad, también se realizaron otros dos experimentos, añadiendo la misma dosis de radiación que sufren los astronautas y los experimentos en la ISS.

El principal objetivo de estos experimentos es conocer si existe un efecto sinérgico de la falta de gravedad y la radiación, en ambas condiciones lumínicas, en la proliferación y crecimiento celular de plántulas de *Arabidopsis thaliana* crecidas en estas condiciones durante 6 días. Para ello, en estos dos últimos experimentos solo se ha llevado a cabo el análisis de los parámetros correspondientes a las técnicas de microscopía del meristemo radicular.

A continuación, se muestra una tabla (TABLA 23) con los resultados obtenidos en microgravedad y radiación en comparación con su correspondiente control (1g y radiación) junto con los resultados obtenidos en microgravedad sin radiación (experimentos anteriores).

Efecto de la microgravedad en presencia (+ Radiación) y ausencia ( – Radiación ) de radiación													
		Fotoperiodo						Oscuridad					
		+ Radiación			– Radiación			+ Radiación			– Radiación		
Línea (genotipo)		WT	nuc1	nuc2	WT	nuc1	nuc2	WT	nuc1	nuc2	WT	nuc1	nuc2
Longitud (mm)	Raíz Tallo	=	=	=	= (-)	= (-)	-	+	=	=	=	=	=
		=	=	=	=	=	=	+	=	+	=	=	=
Proliferación celular (nº células/mm)		=	=	=	=	=	= (-)	=	=	=	= (-)	-	= (-)
Expresión <i>CYCB1;1</i> (D.O.I)		=			=			-			= (+)		
Crecimiento celular (área nucléolo, μm²)		-	=	=	=	=	=	=	+	+	= (-)	-	-
Distribución auxinas (DII-VENUS)		No alterado			No Alterado			No alterado			Alterado		

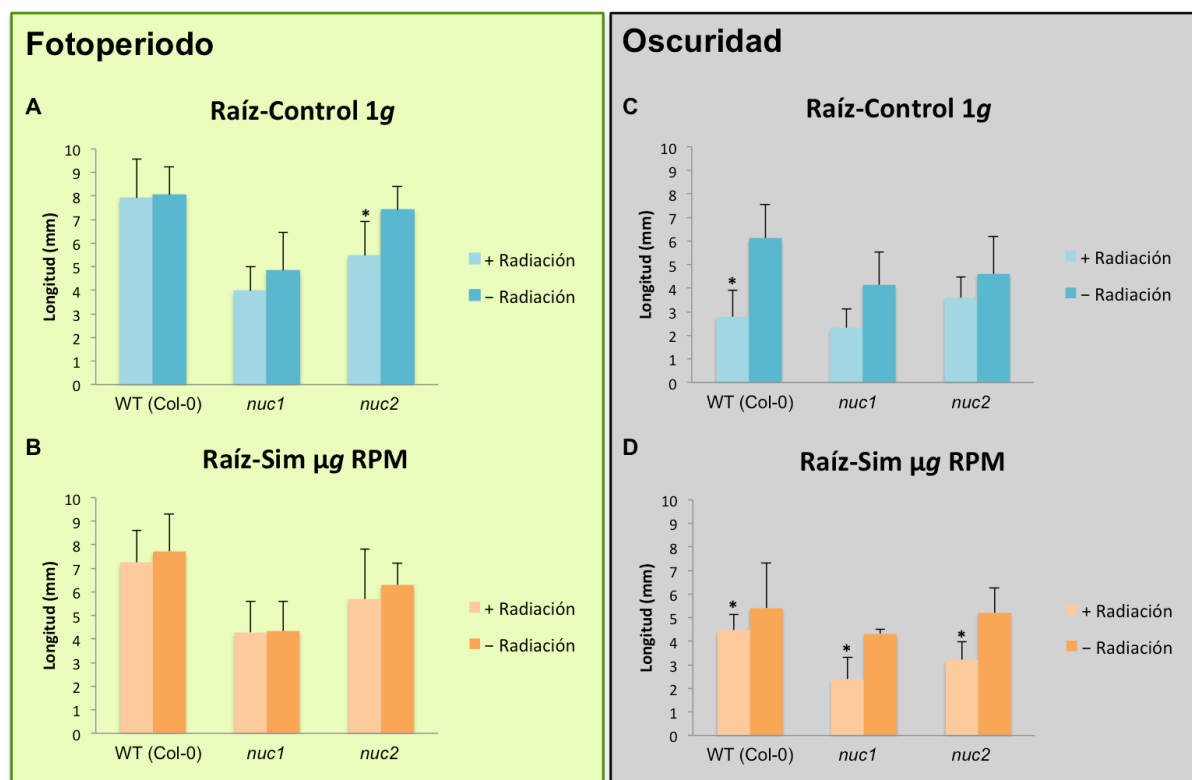
**Tabla 23. Efecto de la microgravedad en presencia y ausencia de radiación, con dos regímenes lumínicos diferentes: fotoperiodo y oscuridad.** En la tabla se recoge los resultados obtenidos tras el análisis de distintos parámetros relacionados con el crecimiento y la proliferación celular, en diferentes líneas de plántulas de *Arabidopsis thaliana* (Col-0, *nuc1*, *nuc2*, *CYCB1;1:uidA* y DII-VENUS) crecidas en microgravedad simulada (Sim  $\mu\text{g}$  RPM) durante 6 días en distintas condiciones de iluminación (fotoperiodo y oscuridad) en presencia y ausencia de radiación comparado con su correspondiente control 1g. Los parámetros que significativamente aumentan, en microgravedad simulada, son mostrados con el signo +, los que disminuyen con el signo – y los que no cambian con el signo = junto con su tendencia (+ ó –).

#### 5.4.1. Efecto de la radiación en condiciones control 1g y microgravedad simulada (Sim $\mu\text{g}$ RPM ) bajo estímulo lumínico (fotoperiodo) y oscuridad

##### 5.4.1.1. Longitud de tallo y raíz

La longitud de la raíz en las muestras crecidas en condiciones control 1g, en presencia de radiación, fue menor en ambas condiciones lumínicas (fotoperiodo y oscuridad) en comparación con las muestras crecidas en ausencia de radiación y en la misma iluminación. En concreto, esta disminución fue estadísticamente significativa en el mutante *nuc2* bajo fotoperiodo y en las plantas *wild type* en oscuridad (FIGURA 91, A y C).

En condiciones de microgravedad simulada, este parámetro también disminuye en las dos condiciones de iluminación, siendo mucho mayor esta disminución en oscuridad donde en los tres genotipos analizados es estadísticamente significativa (FIGURA 91, B y D).

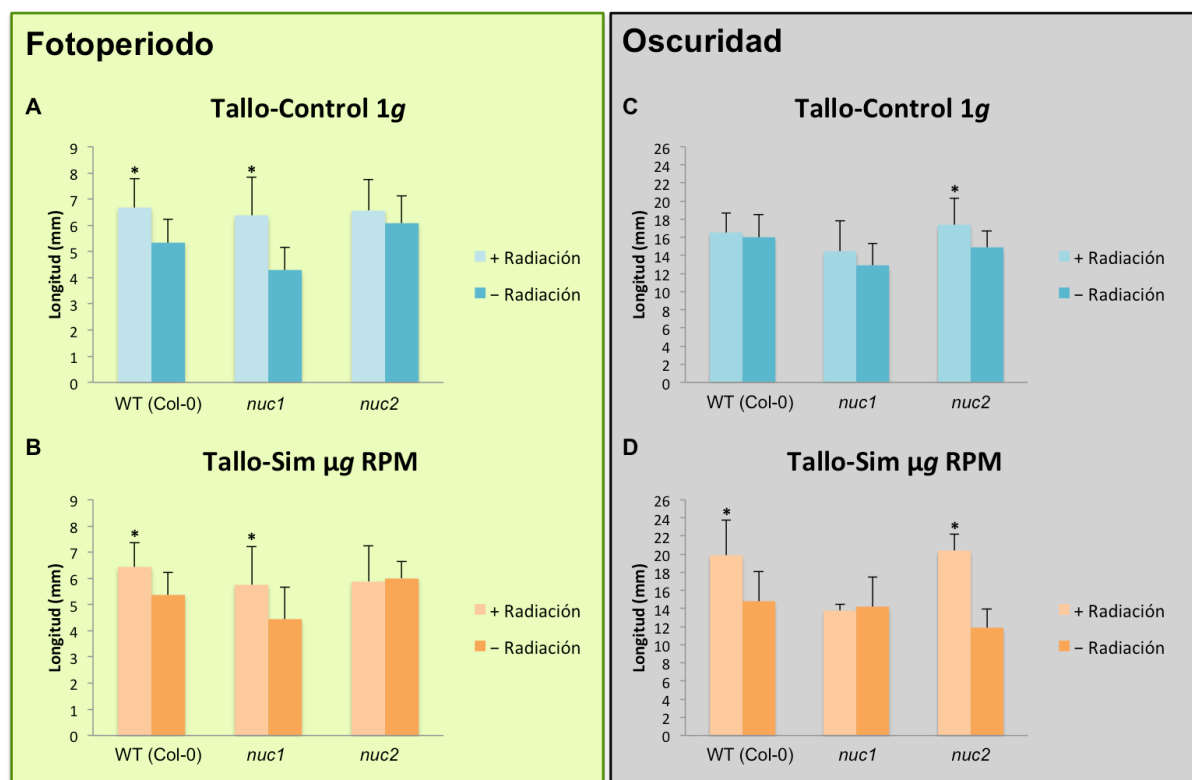


**Figura 91.** Efecto de la radiación en la longitud de plántulas (WT, *nuc1* y *nuc2*) crecidas en condición control 1g y microgravedad simulada (Sim  $\mu$ g RPM) bajo fotoperíodo y en oscuridad. Valor medio con su correspondiente desviación estándar en plántulas crecidas en los dos niveles de gravedad (1g y  $\mu$ g) con fotoperíodo (A y B) o en oscuridad (C y D).

\* Diferencias significativas en presencia de radiación en comparación con la ausencia de radiación ( $p < 0,05$  Test T-Student)

La longitud del tallo fue significativamente mayor bajo estímulo lumínico (fotoperíodo) en presencia de radiación tanto en la condición control 1g como en microgravedad simulada, en las plántulas de genotipo silvestre y las mutante *nuc1*. En el caso de la otra línea mutante (*nuc2*) esta disminución fue menor, observándose únicamente la misma tendencia que en los otros dos genotipos (FIGURA 92, A y B).

En oscuridad se obtuvo, en general, unos tallos más largos en presencia de radiación en comparación con la ausencia de radiación tanto en microgravedad simulada como en la condición control. Este parámetro fue significativamente mayor en la línea mutante *nuc2* en los dos niveles de gravedad y en el genotipo silvestre en microgravedad (FIGURA 92, C y D).



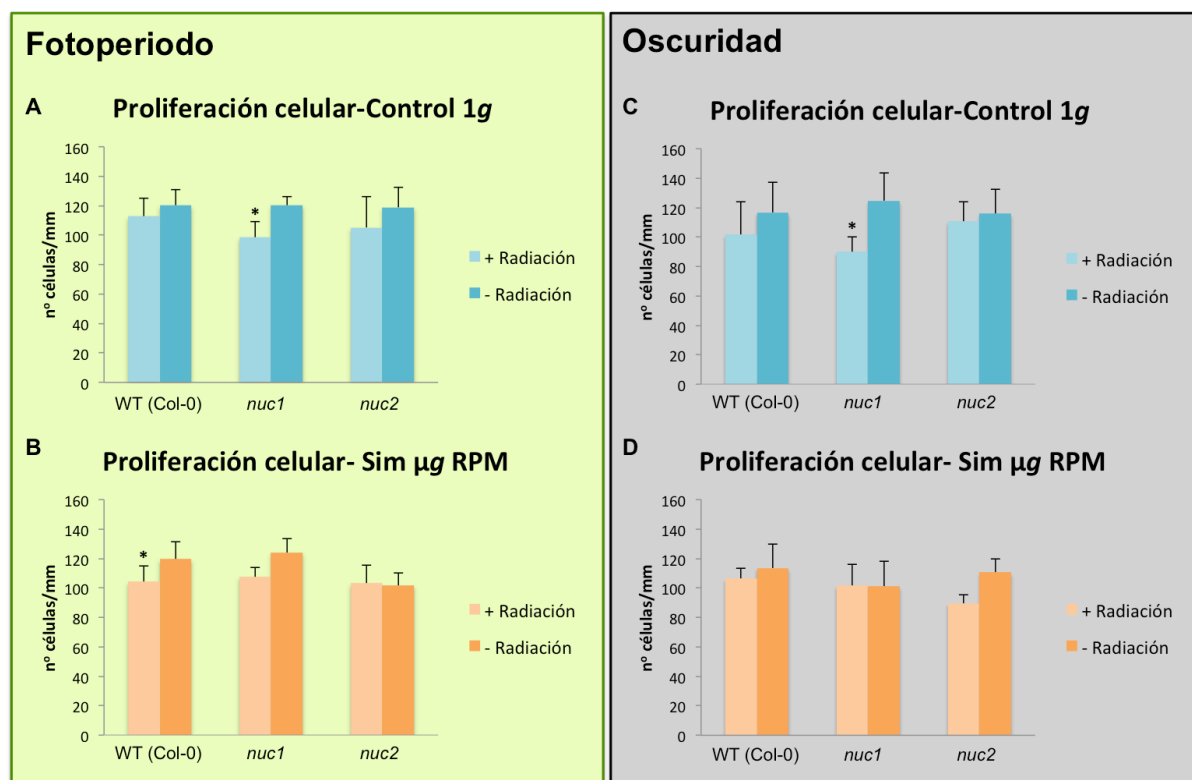
**Figura 92. Efecto de la radiación en la longitud del tallo de tres líneas de plántulas de *Arabidopsis thaliana* (WT, *nuc1* y *nuc2*) crecidas bajo fotoperiodo y oscuridad en microgravedad ( $\mu g$ ) simulada y en gravedad control ( $1g$ ).** En la parte izquierda se muestra la longitud media del tallo de plántulas crecidas con fotoperiodo en los niveles de gravedad terrestre ( $1g$ ) (A) y microgravedad simulada ( $\mu g$ ) (B). En la parte derecha se muestra la longitud media de las plántulas crecidas, en oscuridad y en gravedad control (C) o en microgravedad (D).

\* Diferencias significativas en presencia de radiación en comparación con la ausencia de radiación ( $p < 0,05$  Test T-Student)

#### 5.4.1.2. Proliferación celular: nº células/unidad de longitud (mm)

En el caso de, las plántulas crecidas en régimen lumínico de fotoperiodo, las que fueron sometidas a radiación presentaron una leve disminución en el parámetro medido (nº células/mm) tanto en condiciones de microgravedad simulada como en la condición control  $1g$ . Esta disminución fue significativamente menor en la condición control de gravedad ( $1g$ ) en la línea mutante *nuc1* y en microgravedad simulada en el genotipo silvestre (FIGURA 93, A y B).

En oscuridad ocurre lo mismo que bajo fotoperiodo, en cuanto, a que la radiación provoca un leve disminución en la proliferación celular en los dos niveles de gravedad estudiados, siendo únicamente estadísticamente menor en el mutante *nuc1* en la condición de gravedad terrestre ( $1g$ ) (FIGURA 93, C y D).



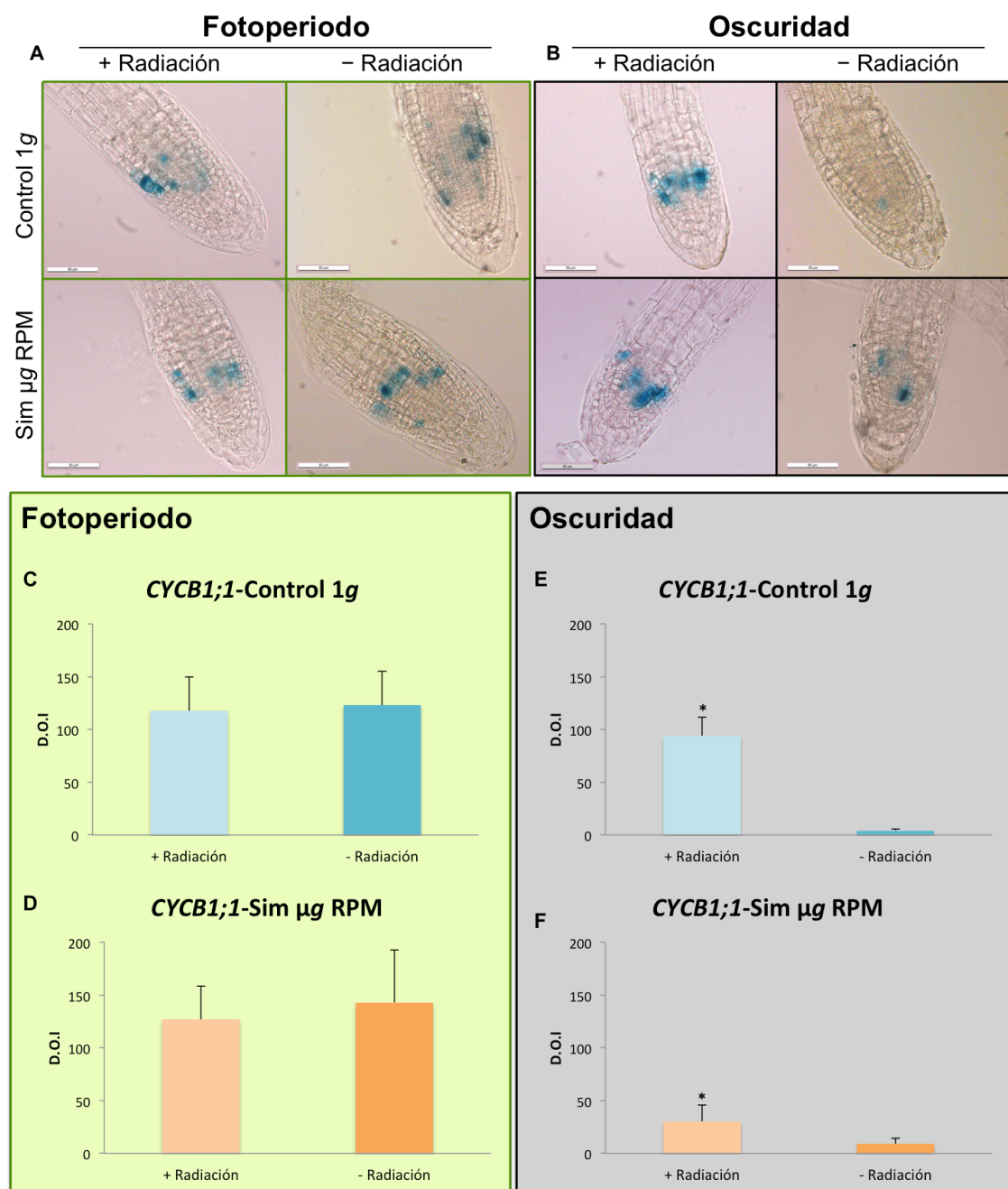
**Figura 93. Efecto de la radiación en la proliferación celular (n° células/mm) bajo dos regímenes lumínicos (fotoperiodo y oscuridad) en la condición control 1g y en microgravedad simulada (Sim µg RPM).** Valor medio del número de células/ mm en las capas de células que forman el meristemo radicular, en las tres líneas de *Arabidopsis thaliana* (WT, *nuc1* y *nuc2*) analizadas, crecidas durante 6 días bajo un régimen lumínico de fotoperiodo (A y B) o en oscuridad (C y D).

\* Diferencias significativas en presencia de radiación en comparación con la ausencia de radiación ( $p < 0,05$  Test T-Student)

#### 5.4.1.3. Expresión del gen de la ciclina B1 mediante análisis histoquímico de la actividad $\beta$ -glucuronidasa (GUS)

La expresión del gen de la ciclina B1 (regulador transición G2/M) en presencia de un estímulo lumínico (fotoperiodo) mostró niveles similares de densidad óptica integrada entre las plántulas crecidas en presencia y ausencia de radiación, tanto en la condición control 1g como en la condición de microgravedad simulada (FIGURA 94, A, C y D).

En cambio, en oscuridad, la expresión de este gen fue significativamente mayor en presencia de radiación en microgravedad simulada y en el nivel de gravedad terrestre, en comparación con sus correspondiente muestra crecida en ausencia de radiación (FIGURA 94, B, E y F).



**Figura 94. Efecto de la radiación en la expresión del gen de la ciclina B1.** Imágenes del meristemo radicular de plántulas de la línea transgénica *CYCB1;1:uidA* tomadas con el microscopio óptico, en campo claro, en presencia y ausencia de gravedad con iluminación (fotoperiodo) (A) o en oscuridad (B). Las barras indican 50 µm. Nivel de expresión del gen de la ciclina B1 en el nivel de gravedad terrestre (1g) y en microgravedad simulada (Sim µg RPM) con estimulación lumínica (fotoperiodo) (C y D) o en oscuridad (E y F).

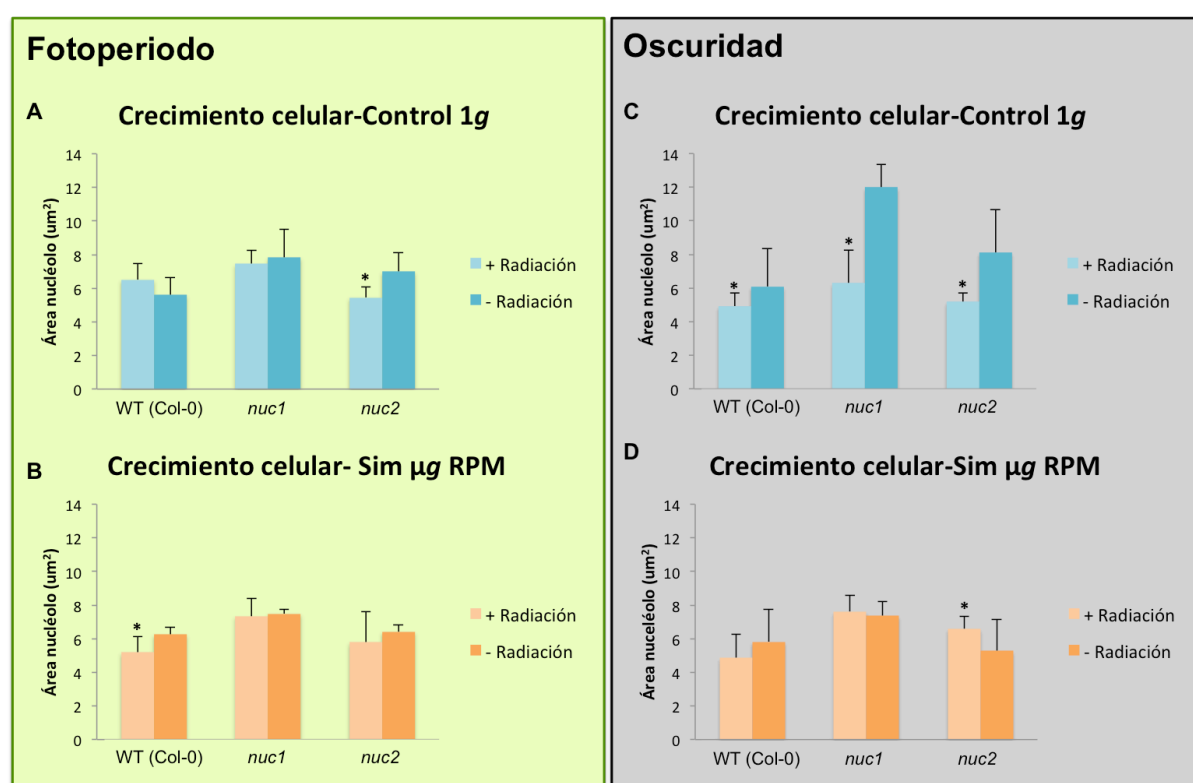
\* Diferencias significativas en presencia de radiación en comparación con la ausencia de radiación ( $p < 0,05$  Test T-Student)



5.4.1.4. Crecimiento celular (Área del nucléolo,  $\mu\text{m}^2$ )

El área del nucléolo medida como el área marcada por la señal de fluorescencia tras una inmunofluorescencia *in toto* con un anticuerpo frente a la proteína nucleolar fibrilarina, fue menor en las plántulas mutantes *nuc2*, cuando crecieron con fotoperiodo en gravedad terrestre y en presencia de radiación (FIGURA 95A). Esta disminución también fue significativamente menor en presencia de radiación, en el genotipo silvestre, con fotoperiodo, en microgravedad simulada (FIGURA 95B).

En oscuridad y en niveles de gravedad terrestre (1g) la radiación produjo una disminución significativa en el crecimiento celular en los tres genotipos analizados (WT, *nuc1* y *nuc2*) (FIGURA 95C). En cambio, en oscuridad y microgravedad simulada (Sim  $\mu\text{g}$  RPM) la radiación produjo un aumento significativo en el área del nucléolo de plántulas mutantes *nuc2* (FIGURA 95D), no produciéndose ese aumento en los otros dos genotipos estudiados, WT y *nuc1*.



**Figura 95. Efecto de la radiación en el crecimiento celular (área nucléolo,  $\mu\text{m}^2$ ) en tres líneas de plantas de *Arabidopsis thaliana* (WT, *nuc1* y *nuc2*) crecidas tanto en microgravedad simulada (Sim  $\mu\text{g}$  RPM) como en niveles de gravedad terrestre (control 1g) bajo dos regímenes de iluminación: fotoperiodo o oscuridad. Valor medio del área del nucléolo de las plántulas crecidas bajo fotoperiodo (A y B) o en oscuridad (C y D) en presencia y ausencia de radiación.**

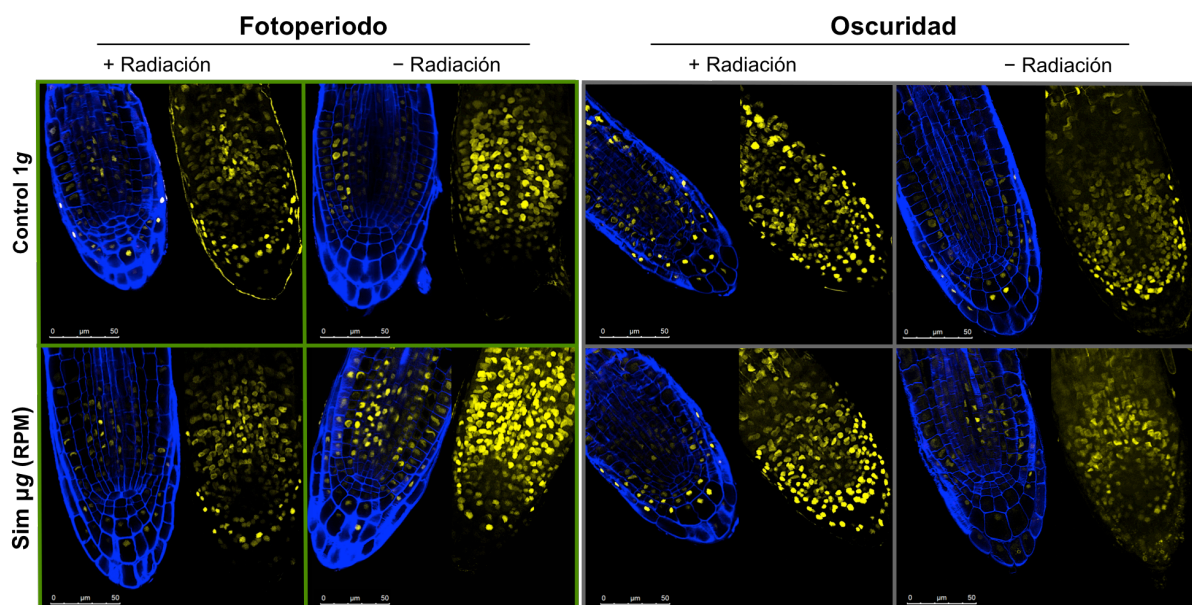
\* Diferencias significativas en presencia de radiación en comparación con la ausencia de radiación ( $p < 0,05$  Test T-Student)

#### 5.4.1.5. Patrón de distribución de auxinas marcado por la línea transgénica DII-VENUS

El patrón de fluorescencia obtenido en presencia de radiación en niveles de gravedad terrestre con fotoperiodo es diferente al obtenido en las mismas condiciones de nivel de gravedad e iluminación, pero en ausencia de radiación. Esta diferencia reside sobre todo en que, en presencia de radiación, la señal de fluorescencia se extiende hacia más abajo del centro quiescente, apareciendo señal en las células de la columela. En cambio, en el nivel de gravedad correspondiente a la superficie de la Tierra ( $1g$ ) y oscuridad el patrón de fluorescencia es el mismo tanto en presencia como en ausencia de radiación.

Tampoco se observa ninguna variación en el patrón de señal de fluorescencia entre las plántulas crecidas en presencia y ausencia de radiación en microgravedad simulada para ninguno de los dos regímenes de iluminación (fotoperiodo y oscuridad) (FIGURA 96).

Si comparamos el patrón de distribución de auxinas obtenido en presencia de radiación en condiciones lumínicas de fotoperiodo entre el control  $1g$  y microgravedad simulada no se obtuvo ninguna diferencia. Esto mismo ocurre al comparar los dos niveles de gravedad en oscuridad y presencia de radiación (FIGURA 96).



**Figura 96. Efecto de la radiación en la distribución de auxinas. Fotografías tomadas en el microscopio láser confocal correspondientes a un corte central (izquierda) y a la proyección máxima (derecha) para cada condición son mostradas.** La señal azul de fluorescencia se corresponde con la tinción de las membranas celulares con Reineck y la señal de fluorescencia amarilla se corresponde con la señal de la proteína YFP DII-VENUS (yellow fluorescence protein). Las barras indican 50  $\mu\text{m}$ . Plántulas crecidas con fotoperiodo en presencia y ausencia de radiación en niveles de gravedad control  $1g$  y en microgravedad simulada (Sim  $\mu\text{g}$  RPM) (izquierda). Plántulas crecidas en oscuridad en presencia y ausencia de radiación en los dos niveles de gravedad ensayados (derecha).

## Resultados

A continuación, se presenta una tabla (TABLA 24) con el efecto de la radiación en la proliferación y el crecimiento celular, en la condición control de gravedad (1g) y en microgravedad simulada (Sim  $\mu g$  RPM), tanto en plántulas crecidas con fotoperiodo como en oscuridad.

Efectos de la radiación en la condición control 1g						
		Fotoperiodo			Oscuridad	
Línea (genotipo)		WT	nuc1	nuc2	WT	nuc1 nuc2
Longitud (mm)	Raíz	=	=	-	-	= (-) = (-)
	Tallo	+	+	= (+)	= (+)	= (+) +
Proliferación celular (nº células/mm)		= (-)	-	= (-)	= (-)	- = (-)
Expresión <i>CYCB1;1</i> (D.O.I)		=			+	
Crecimiento celular (área nucléolo, $\mu m^2$ )		=	=	-	-	- -
Distribución auxinas (DII-VENUS)		Alterado			No alterado	
Efectos de la radiación en la condición de microgravedad simulada (Sim $\mu g$ RPM)						
		Fotoperiodo			Oscuridad	
Línea (genotipo)		WT	nuc1	nuc2	WT	nuc1 nuc2
Longitud (mm)	Raíz	=	=	=	-	- -
	Tallo	+	+	=	+	= +
Proliferación celular (nº células/mm)		-	= (-)	=	= (-)	= = (-)
Expresión <i>CYCB1;1</i> (D.O.I)		=			+	
Crecimiento celular (área nucléolo, $\mu m^2$ )		-	=	=	=	= +
Distribución auxinas (DII-VENUS)		No alterado			No alterado	

**Tabla 24. Efecto de la radiación, en la proliferación y crecimiento celular, en dos niveles distintos de gravedad (1g y  $\mu g$ ) y bajo dos regímenes lumínicos (fotoperiodo y oscuridad).** En la parte superior de la tabla se recogen los resultados obtenidos al nivel de gravedad presente en la superficie terrestre (1g) y en la parte inferior se muestran los resultados obtenidos en microgravedad simulada (Sim  $\mu g$  RPM). Los parámetros que no sufrieron ningún cambio al comparar las plántulas crecidas en presencia de radiación con las que los hicieron en ausencia de radiación se indican con el signo = (indicándose cuando es clara su tendencia, + ó -). Los parámetros que cambian estadísticamente de forma significativa en presencia de radiación se indican con los signos + y -, al aumentar o disminuir, respectivamente.

# DISCUSIÓN

- 1. Alteración de la competencia meristemática en condiciones de simulación de gravedad parcial: Avances sobre los resultados del experimento espacial “Root”**
- 2. La magnitud del vector gravedad mínima para un desarrollo normal de la planta podría estar comprendido entre 0,17g y 0,38g**
- 3. El estímulo lumínico (fotoperiodo) atenúa los efectos causados por la microgravedad**
- 4. La falta de sacarosa en ausencia de estímulo lumínico produce un estrés más fuerte que la falta de gravedad**
- 5. La luz roja tiene un efecto compensador en el desajuste producido por la microgravedad en oscuridad en la competencia meristemática**
- 6. El efecto de la radiación crónica y de baja dosis es atenuado por la microgravedad simulada**
- 7. Contribución de los resultados obtenidos a la exploración espacial**

## Discusión

### **1. Alteración de la competencia meristemática en condiciones de simulación de gravedad parcial: Avances sobre los resultados del experimento espacial “Root”**

El experimento “Root”, llevado a cabo en la Estación Espacial Internacional (ISS) en el curso de la “Misión Soyuz Española”, produjo un importante resultado en cuanto a los efectos del ambiente espacial, en particular la ausencia de gravedad, sobre el crecimiento y la proliferación celular en el meristemo de la raíz. La competencia meristemática, es decir, la coordinación entre crecimiento y proliferación que permite a estas células ser la base de la diferenciación y el desarrollo de la planta (Matía et al. 2010), aparece fuertemente alterada en condiciones de ausencia de gravedad. Estos resultados, obtenidos inicialmente en microgravedad real, en el espacio, se confirmaron en microgravedad simulada, utilizando la Random Positioning Machine (RPM), realizando estudios secuenciales y utilizando diferentes métodos de análisis (Matía et al. 2010, 2009; Boucheron-dubuisson et al. 2016).

Uno de los objetivos del presente trabajo ha sido avanzar sobre la base de los resultados del experimento “Root”. Para ello, realizamos un experimento en ESTEC, utilizando la RPM, en el que nos planteamos hasta qué medida los efectos encontrados en condiciones de microgravedad podrían extenderse a magnitudes de gravedad fraccional, intermedias entre 0 y 1.

El interés de este experimento era múltiple. Por una parte, los niveles de gravedad fraccional son los que caracterizan a la Luna y a Marte, que constituyen a día de hoy los objetivos más inmediatos de los planes de exploración espacial por el ser humano. En segundo lugar, estaba desarrollándose la tecnología necesaria para simular en Tierra estos niveles de gravedad fraccional y era necesario realizar una validación biológica de esta nueva tecnología. Finalmente, desde un punto de vista estrictamente biológico, este experimento suponía profundizar seriamente en los resultados previos sobre el efecto de la alteración de la gravedad sobre el meristemo de la raíz y determinar los valores “umbral” del vector gravedad capaces de desencadenar la respuesta gravitrópica.

A día de hoy, muy pocos experimentos se han llevado a cabo a niveles parciales de gravedad, siendo el más relevante el experimento TROP-2 en el que las plantas crecieron en la centrífuga del EMCS en la ISS (Kiss et al. 2012; Correll et al. 2013).

La tecnología desarrollada en ESTEC consistía en la simulación de niveles parciales de gravedad mediante dos métodos o paradigmas: uno de ellos implicaba la modificación del software que dirige el funcionamiento de la RPM y el otro un cambio en el hardware, concretamente la implementación de una centrífuga sobre el dispositivo simulador de microgravedad.

Obviamente, en continuidad con los experimentos anteriores basados en el “Root”, se utilizó *Arabidopsis thaliana* como sistema modelo de plantas, las cuales crecieron en las mismas condiciones (4 días en oscuridad y con sacarosa). El modo regular de simulación de microgravedad en la RPM fue incluido como un control de buen funcionamiento, replicando los experimentos complementarios al “Root” y basados en el mismo.

Los resultados obtenidos en microgravedad ( $\mu g$ ) y en la condición de gravedad parcial correspondiente a la magnitud presente en la Luna ( $0,17g$ ) muestran que la exposición a estos niveles de gravedad produce alteraciones en los parámetros de crecimiento y proliferación celular, conduciendo a una disrupción de la competencia meristemática en estadios tempranos de desarrollo de la planta. En concreto, la ratio local de proliferación celular ( $n^{\circ}$ células/mm) aumenta en comparación con la condición control ( $1g$  estático), mientras que el área del nucléolo disminuye indicando una reducción en el procesamiento del pre-rRNA y síntesis de proteínas, y por tanto, del crecimiento celular.

Los resultados de microgravedad están en total concordancia con las observaciones previas realizadas en el laboratorio a partir del experimento espacial “Root” y los experimentos subsiguientes complementarios en microgravedad simulada, tanto en la misma instalación, RPM (Matía et al. 2009, 2010; Boucheron-dubuisson et al. 2016), como en otras instalaciones simuladoras de ambientes de gravedad alterada, como es el levitador magnético (Ana I. Manzano et al. 2013). En estos experimentos la medición de los mismos parámetros en plántulas crecidas en las mismas condiciones de crecimiento (4 días oscuridad con sacarosa) resultó en el desacople de los dos procesos celulares característicos de las células que forman el meristemo (crecimiento y proliferación celular) y que son necesarios para el desarrollo de la planta.

Por otra parte, el resultado obtenido en la gravedad lunar simulada (0,17g) es totalmente novedoso. La similitud de los efectos de este nivel de gravedad con los obtenidos en microgravedad indica que esta magnitud de  $g$  no es capaz de desencadenar respuesta gravitrópica, ya sea mediante la sedimentación de los estatolitos en la columela de la raíz o mediante posibles mecanismos alternativos de percepción de la gravedad existentes en las propias células meristemáticas. Aunque en experimentos espaciales anteriores, como en la misión IML 1, la sedimentación de los estatolitos en las raíces de plantas de lenteja ocurrió a niveles de gravedad inferiores a 0,1g (Perbal y Driss-Ecole 1994) nuestros resultados indican que este estímulo no se transduce a las células meristemáticas de la misma forma que en condiciones de gravedad control, sino que estas responden como si no hubiera ningún estímulo gravitatorio.

Los efectos obtenidos a nivel celular en  $\mu g$  y 0,17g indican la existencia de alteraciones en la regulación del ciclo celular. El punto de chequeo de tamaño celular ocurre en la fase G2 y transición G2/M, momento en el cual también tiene lugar la mayor producción de ribosomas (actividad nucleolar) y, consiguientemente, de proteínas (crecimiento celular) como preparación para la entrada en mitosis. En consecuencia, un acortamiento de la fase G2 podría resultar en una aceleración de la división celular (división prematura de las células antes de alcanzar el tamaño requerido en la condición 1g control) produciéndose un mayor número de células de menor tamaño. Esta interpretación está apoyada por la reducción en los niveles de nucleolina, la principal proteína nucleolar, tanto en condiciones de microgravedad real, como simulada (Ana I. Manzano et al. 2013; Matía et al. 2005, 2007).

Este acortamiento del ciclo celular es también indicado por la reducción en la expresión del gen de la ciclina B1 en condiciones de  $\mu g$  y 0,17g, obtenida en este experimento y en previos del laboratorio en microgravedad simulada en las dos instalaciones mencionadas anteriormente (Boucheron-dubuisson et al. 2016; Ana I. Manzano et al. 2013; Matía et al. 2009). La ciclina B1 es una proteína reguladora de la transición G2/M que tiene su máxima expresión durante la fase G2 y es degradada en anafase, siendo un buen indicador de proliferación celular, por lo que una menor expresión de esta proteína es compatible con un acortamiento de la fase G2.

En experimentos anteriores realizados con cultivos celulares en microgravedad simulada y en un trabajo publicado recientemente, donde se incorpora la simulación de

gravedad parcial, se ha obtenido una aceleración del ciclo celular acompañada de un menor número de nucléolos activos y una disminución en los niveles de nucleolina, en las condiciones experimentales de gravedad respecto del control de gravedad terrestre. La utilización de células sincronizadas en su progreso en el ciclo celular demuestra inequívocamente el acortamiento de la fase G2 en condiciones de microgravedad simulada (Kamal et al. 2018a, 2018b; Ana I. Manzano et al. 2016).

La mayoría de las alteraciones encontradas en este experimento en el nivel de gravedad de la Luna (0,17g) no aparecen en la gravedad correspondiente a Marte (0,38g), condición en la que las alteraciones son muy suaves y no difieren claramente de los resultados obtenidos en la condición de 1g estático. Estos resultados pueden ser importantes en la determinación del valor umbral de detección de la gravedad.

El efecto que causa el nivel de gravedad parcial 0,17g, en las células meristemáticas de la punta de la raíz, cuantitativamente más intenso que el producido por la  $\mu g$  también fue observado en un experimento realizado con cultivo celular a niveles parciales de gravedad simulados en el levitador magnético. A pesar, de las limitaciones de este estudio, por el corto periodo de tiempo de exposición a microgravedad e interferencias causadas por el campo magnético, el estudio transcriptómico realizado mostró una mayor alteración del estatus transcripcional bajo 0,1g\* que en la condición 0g\* (Ana I Manzano et al. 2012a).

El método o paradigma de simulación hardware (RPM<sup>HW</sup>) nos permite realizar un control interno al poder generar la centrífuga instalada en el interior de la RPM el nivel de gravedad equivalente al terrestre (1g HW) y poder ser comparado con el control 1g estático. Esta comparación nos permitiría identificar los efectos producidos por la centrifugación y los artefactos hipotéticamente inducidos por la RPM en los parámetros estudiados. Sorprendentemente, en el caso de genotipo silvestre (Col-0) los valores obtenidos entre ambos niveles de gravedad 1g son de la misma magnitud sin diferencias significativas, pero en el caso del mutante *nuc2* los valores obtenidos son divergentes y significativamente diferentes. Esto puede ser debido a que el mutante no posee la proteína nucleolar nucleolina 2, que es la que se expresa y tiene un papel importante en condiciones de estrés, dando explicación también a la respuesta diferente en cuanto al tamaño del nucléolo (no hay diferencias significativas en las condiciones  $\mu g$  y 0,17g en comparación con el control 1g estático).

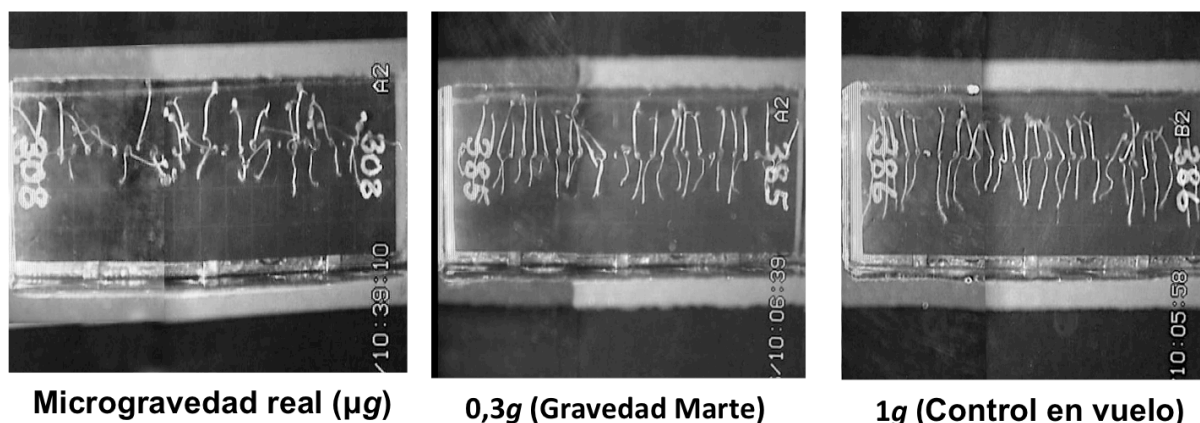


Sin embargo, no puede ser excluido que las diferencias encontradas en la RPM<sup>HW</sup> sean debidas a un estrés mecánico o vibraciones residuales de la centrífuga, ya que este mismo efecto fue sugerido en un experimento comparable realizado en hipergravedad con plántulas de *Arabidopsis thaliana* utilizando la centrífuga de gran diámetro (LDC, *large diameter centrifuge*), en el cual se encontraron diferencias en el tamaño nucleolar entre el control 1g rotacional y el control 1g estático (Ana I. Manzano et al. 2012b).

## **2. La magnitud del vector gravedad mínima para un desarrollo normal de la planta podría estar comprendida entre 0,17g y 0,38g**

Los resultados obtenidos en el experimento realizado en ESTEC en el que se observa una pérdida de la competencia meristemática en las plántulas crecidas a niveles de gravedad de 0,17g, pero un balance entre crecimiento y proliferación celular en los niveles de gravedad 0,38g similar a la condición control, sugieren fuertemente que el valor umbral de detección completa de la gravedad podría ser un vector  $g$  de una magnitud intermedia entre estos dos niveles de gravedad parcial. Además, esta propuesta está soportada por el hecho de que en las plántulas crecidas en la Estación Espacial Internacional sometidas a un vector de 0.3g generado por la centrífuga del EMCS, durante el desarrollo del experimento “Seedling Growth”, las raíces muestran un crecimiento en la misma dirección del vector gravedad (gravitropismo positivo) de igual forma que el control 1g en vuelo. Esta orientación de la raíz o gravitropismo positivo no se observa en las plántulas crecidas en microgravedad real ([FIGURA 97](#)).

Para interpretar este resultado y evaluar sus consecuencias debemos recapitular el hecho de que las plantas poseen dos procesos iniciados por la percepción de la gravedad, el gravitropismo y la gravirresistencia. El gravitropismo usa la gravedad para orientar en el espacio el crecimiento de la planta, por lo que la dirección del vector gravedad influye, en esta respuesta, más que la magnitud. La respuesta gravitrópica está asociada con la percepción de la dirección del vector gravedad por los estatolitos de las células de la columela (células especializadas) y se ha descrito que la curva de respuesta es una función hiperbólica (Perbal et al. 2002; Driss-Ecole et al. 2008).



**Figura 97. Fotos de cassettes de plántulas de *Arabidopsis thaliana* genotipo silvestre tras 6 días de crecimiento en la Estación Espacial Internacional.** La figura muestra los distintos niveles de gravedad ejercidos sobre las plantas durante las distintas fases del experimento espacial “Seedling Growth”. Las raíces de las plántulas crecidas en microgravedad real no tienen orientación o lo que es lo mismo pierden la respuesta gravitrópica. En cambio, las plantas sometidas a un vector gravedad similar al existente en la superficie de Marte presentan la misma orientación que las plantas crecidas a niveles de gravedad terrestre, lo que indica que inician una respuesta gravitrópica.

La gravirresistencia es la capacidad de las plantas para resistir la gravedad y desarrollar partes aéreas rígidas capaces de adoptar posiciones no necesariamente impuestas por la fuerza de la gravedad, por lo que es esencialmente influenciada por la magnitud de la gravedad (Hoson et al. 2005). La base celular de este proceso está en la existencia de canales de iones mecanosensibles y a la reorientación de los microtúbulos y su curva de respuesta es una función logarítmica (Takayuki Hoson et al. 2010; Soga et al. 2001).

Una diferencia importante entre los dos procesos de respuesta a la gravedad es que el gravitropismo necesita de células especializadas (“profesionales”): los estatocitos presentes en la columela de la punta de la raíz y en los órganos equivalentes del ápice del tallo. Por el contrario, las estructuras celulares responsables de la gravirresistencia son genéricas a todas las células, cualesquiera que sea su grado de diferenciación y su posible especialización.

Así pues, cambios en los dos componentes del vector gravedad (dirección y magnitud) podrían tener efectos diferentes, complementarios o aditivos en el programa de desarrollo de las plantas (Morita 2010), de tal manera, que, a partir de un valor umbral de gravedad, los órganos sensores del gravitropismo, como es la columela de la raíz, responderían a la dirección del vector gravedad y se producirían fenotipos similares independientemente de la magnitud del vector (Herranz y Medina 2014). Esto es lo que habría ocurrido en el experimento realizado en la RPM de ESTEC, en el que se

observaron efectos similares en microgravedad y gravedad lunar ( $0,17g$ ), por una parte y en gravedad de Marte ( $0,38g$ ) y gravedad terrestre ( $1g$ ) por otra. Esto significa que una magnitud del vector gravedad correspondiente a  $0,38g$  sería suficiente para que la planta capte la dirección del vector e inicie una respuesta gravitrópica. La confirmación de este descubrimiento podría ser altamente relevante y tener consecuencias en la exploración espacial. Por ejemplo, sería menos problemático cultivar plantas en Marte que en la Luna.

### **3. El estímulo lumínico (fotoperiodo) atenúa los efectos causados por la microgravedad**

Las plántulas de *Arabidopsis thaliana* (Col-0, *nuc1* y *nuc2*) crecidas en microgravedad simulada en la RPM de Toulouse con régimen lumínico de fotoperiodo (16 h luz blanca/8h oscuridad) presentan unos tallos y raíces orientados de igual forma que las plantas crecidas en gravedad terrestre ( $1g$ ). Es decir, los tallos muestran fototropismo positivo y gravitropismo negativo, mientras que las raíces muestran fototropismo negativo y gravitropismo positivo. Está descrito que la luz influye en la respuesta gravitrópica y que la gravedad afecta a las respuestas lumínicas, existiendo en el tallo un efecto predominante de la luz sobre la respuesta a la gravedad, mientras que en la raíz la respuesta a la gravedad es predominante sobre la de la luz (Hangarter 1997; Molas y Kiss 2009).

Experimentos realizados en la Estación Espacial Internacional, en microgravedad real, han mostrado que, en estas condiciones, la orientación del crecimiento de la raíz depende de la dirección de la fuente de luz sobre las plantas. Plantas de *Arabidopsis thaliana* crecidas durante el experimento APEX01 en el *hardware* ABRS (*Advanced Biological Research System*) con luz direccional, igual que en la RPM, mostraron raíces con un crecimiento ordenado igual que su correspondiente control en tierra (Paul et al. 2013b, 2012). Por el contrario, plantas crecidas en el *hardware* CARA, con luz ambiental o en oscuridad mostraron en microgravedad raíces totalmente desorientadas con una dirección de crecimiento aleatoria (Ferl y Paul 2016; Paul et al. 2017; Nakashima et al. 2014).

Además, estudios realizados en experimentos espaciales también demostraron que los cambios de dirección de la raíces de plantas Col-0 eran mucho más dramáticos en oscuridad que en presencia de luz (Kwon et al. 2015; Nakashima et al. 2014).

El estudio realizado en el tallo para analizar el procesamiento del pre-rRNA tuvo por objeto no sólo identificar eventuales alteraciones en pasos concretos de la biogénesis de ribosomas, sino también investigar si existe una respuesta diferencial entre la parte aérea de la planta y la raíz. Este estudio mostró que la falta de gravedad no altera este proceso en presencia de luz (fotoperiodo) en ninguno de los tres genotipos estudiados. Esto puede ser debido a que, como en el tejido aéreo de la planta la señal lumínica predomina sobre la señal gravitrópica, la presencia de una fuente de luz direccional es suficiente para que el tallo oriente su crecimiento hacia esta fuente y se desarrolle de forma normal (igual que en presencia de gravedad terrestre), realizando la fotosíntesis con plena eficiencia. Experimentos realizados en el meristemo apical de plántulas de *Arabidopsis thaliana* han demostrado que la luz blanca es capaz de rescatar la parada del ciclo celular en las transiciones G1/S y G2/M ocurrida en oscuridad y de promover la biogénesis de ribosomas (Mohammed et al. 2017; Lopez-Juez et al. 2008).

El patrón de bandas diferente obtenido con los cebadores “all VAR” entre el genotipo silvestre (Col-0) y los dos mutantes de nucleolina (*nuc1* y *nuc2*) ha sido descrito anteriormente y confirmado en este experimento. En experimentos realizados en el laboratorio del Dr. Sáez-Vásquez se ha demostrado la existencia de cuatro variantes transcripcionales en el extremo 3'ETS del rRNA, las cuales se expresan de forma diferencial en función del genotipo, siendo la mayor diferencia la acumulación de la variante VAR1 en las dos líneas mutantes y no en la línea WT (Pontvianne et al. 2010; Durut et al. 2014).

El mayor número de bandas obtenidas en el extremo 3'ETS se corresponde con la mayor acumulación de este extremo y del pre-rRNA obtenidas por qPCR y *primer extension* en el mutante *nuc1* (Pontvianne et al. 2010, 2007). Aunque intentamos localizar cambios, incluso aunque fueran sutiles, en la intensidad de acumulación de algunas de estas bandas que podría estar acelerada o decelerada en situaciones de estrés gravitatorio y particularmente en las plántulas mutantes, no fuimos capaces de detectar ninguna variación clara.

El estudio de la competencia meristemática en el meristemo radicular de las plántulas crecidas en este experimento (Col-0, *nuc1* y *nuc2*), mediante parámetros celulares (nº células/mm, expresión de ciclina B1 por tinción histológica GUS y área de nucléolo marcada por fibrilarina) indica que las plántulas mantienen el crecimiento y proliferación de las células meristemáticas a niveles equivalentes a los de su correspondiente control 1g, por lo que la microgravedad no tiene ningún efecto en estos dos procesos. Esto también lo evidencia la longitud de la raíz en los tres genotipos en las dos condiciones experimentales, que también describe Paul *et al.* (2017) en el experimento CARA, desarrollado en la ISS, en las plántulas crecidas en presencia de luz (Paul *et al.* 2017). La presencia de una fuente de luz direccional (fotoperiodo), que permite a la planta realizar la fotosíntesis y por lo tanto que se produzca el transporte de los azúcares fotosintéticos vía tubos cribosos desde los cotiledones hasta el meristemo radicular, podría explicar el mantenimiento de la competencia meristemática en microgravedad bajo iluminación (Xiong *et al.* 2013; Kircher y Schopfer 2012). Los azúcares fotosintéticos son esenciales para la activación de la quinasa TOR, que tiene un papel central en la regulación y coordinación del crecimiento y la proliferación celular (Nishihama y Kohchi 2013; Sablowski y Carnier Dornelas 2014; Weis *et al.* 2015a).

Los resultados obtenidos, además, están en concordancia con los resultados observados en otro experimento llevado a cabo en condiciones equivalentes, en cuanto a que plántulas de *Arabidopsis thaliana* de la línea reportera *CYCB1;1:uidA* crecieron en microgravedad simulada, en este caso en un clinostato 2D, durante 3, 7 y 10 días con régimen lumínico de fotoperiodo. Estas plantas no mostraron diferencias a los 7 días de crecimiento (periodo de tiempo comparable con los experimentos presentados en este trabajo) entre el control 1g y la microgravedad simulada en la longitud del meristemo radicular ni en el número de células del mismo (parámetros equivalentes a nº células/mm), ni tampoco en los niveles de expresión de la ciclina B1 tras la tinción histológica GUS, ni en las fases del ciclo celular analizadas por citometría de flujo, únicamente utilizando los apéndices radiculares (meristemo radicular) (Boucheron-Dubuisson *et al.* 2016).

El estudio realizado a nivel molecular del estatus de proliferación y crecimiento celular en la raíz mostró cambios de expresión en los genes marcadores de estos procesos. En las tres líneas de plantas utilizadas (Col-0, *nuc1* y *nuc2*) se obtuvo una disminución en la expresión del gen *EIR1* o *PIN2*, lo cual no está acompañado por el patrón de distribución de auxinas observado en la línea DII-VENUS, el cual no cambia entre las muestras crecidas en microgravedad y el control 1g. En otros dos experimentos espaciales, CARA (luz ambiental del módulo *Destiny* de la ISS) y APEX03-2 (luz direccional en el *hardware Vegetable Poduction System*), tampoco se obtuvieron diferencias en el patrón de fluorescencia de la línea pDR5r::GFP del meristemo radicular entre las muestras crecidas en microgravedad real y su correspondiente control en Tierra (Ferl y Paul 2016). Es posible que la microgravedad en presencia de luz no afecte al transporte polar de auxinas en la punta de la raíz debido a una redundancia funcional entre proteínas o transportadores PIN (patrones de expresión superpuestos parcialmente) descrita en varios trabajos; en concreto, se ha descrito que PIN1 y PIN2 podrían compensar cada uno de ellos la función del otro (Blilou et al. 2005; Swarup et al. 2001; Ueda et al. 2014). La existencia de cambios puntuales en la expresión de genes concretos del transporte de auxinas (*PIN2*), indica que el proceso es sensible a la falta de gravedad, pero la eficiencia global del proceso, en su conjunto, no se alteraría por la existencia de mecanismos capaces de contrarrestar estas alteraciones de expresión.

Los niveles de expresión del gen de la ciclina B1 también sufrieron una drástica disminución en la condición experimental respecto del control de gravedad terrestre en los genotipos WT-Col-0, *nuc1* y *nuc2*. Este resultado está apoyado por los experimentos previos del laboratorio en donde se mide la expresión de este gen por tinción histológica GUS tanto en microgravedad real como simulada en el meristemo radicular de plántulas de *Arabidopsis thaliana* (Ana I. Manzano et al. 2009; Matía et al. 2009), así como por la disminución en la expresión de este gen, cuantificado por qRT-PCR, en el cultivo celular MM2d (*Arabidopsis thaliana* ecotipo *Landsberg erecta*) expuesto durante 3h a microgravedad simulada en la RPM. En este caso, el acortamiento de la fase G2 del ciclo celular que se observó no se asoció a un tamaño celular distinto entre ambas condiciones experimentales ( $\mu g$  y 1g) (Ana I. Manzano et al. 2016).

El procesamiento del pre-RNA, y por tanto, la biogénesis de ribosomas en las células de la raíz, está afectado en microgravedad simulada en la línea silvestre y el mutante *nuc2*, como indica la mayor acumulación de ambos extremos (5'ETS y 3'ETS) del transcrito primario y del rRNA 25S. Lo mismo ocurrió en experimentos realizados en la RPM con el cultivo celular MM2d. En estos experimentos se analizó la estructura del nucleolo como parámetro marcador de la actividad, definiéndose una clasificación del nucléolo en distintos tipos estructurales que corresponden a estados funcionales: vacuolado (altamente activo y presente principalmente en la fase G2 del ciclo celular), compacto (activo y típico de la fase G1) y fibrilar (inactivo y presente en la fase G0). En estos experimentos, el porcentaje de nucléolos de tipo vacuolar y compacto disminuye drásticamente en microgravedad simulada respecto de su control 1g, lo que indica un peor procesamiento del rRNA y menor eficiencia de la biogénesis de ribosomas (Kamal et al. 2018b; Ana I. Manzano et al. 2016).

En la línea mutante *nuc1* la mayor acumulación en el RNA 25S indica un peor procesamiento y una biogénesis de ribosomas menos eficiente en microgravedad simulada, pero la menor acumulación de los extremos 5'ETS y 3'ETS indica lo contrario. La forma, el tamaño y la morfología del nucléolo están determinados por el balance entre la producción de precursores de ribonucleoproteínas ribosomales (RNP) y la demanda de ribosomas desde el citoplasma (Goessens 1976) y el procesamiento del pre-rRNA en el mutante *nuc1* ocurre de forma defectiva en las primeras etapas (Pontvianne et al. 2007). Por tanto, si el procesamiento ocurre de forma anómala, el rRNA final procesado correctamente se habrá producido defectivamente respecto a lo necesario para sintetizar la cantidad requerida de ribosomas, aumentando la demanda de precursores, lo que explicaría la menor acumulación de estos extremos.

Los resultados obtenidos al crecer plántulas de *Arabidopsis thaliana* de distintos genotipos indican que si las condiciones de crecimiento son óptimas (nutrientes, luz, temperatura, humedad y aireación) las plantas pueden crecer y desarrollarse con normalidad en ausencia de gravedad, mostrando pequeñas alteraciones a nivel molecular, pero no a nivel celular. Experimentos llevados a cabo en la ISS han demostrado que plantas crecidas en microgravedad real son capaces de sobrevivir llegando a su estado adulto, completando un ciclo vital completo y produciendo semillas

viabiles, mostrando solo pequeñas anormalidades en su crecimiento (Kuang et al. 1996; Link et al. 2014; Massa et al. 2013; De Micco et al. 2014).

#### **4. La falta de sacarosa en ausencia de estímulo lumínico produce un estrés más fuerte que la falta de gravedad**

Las plantas crecidas durante 6 días en oscuridad en microgravedad simulada muestran unas raíces y tallos totalmente desorientados en comparación con el control 1g, en el que las raíces muestran gravitropismo positivo y los tallos gravitropismo negativo. La desorientación en el crecimiento de las plantas al crecer en ausencia de sus principales estímulos, la luz y la gravedad, ha sido observada y descrita en experimentos llevados a cabo recientemente en el espacio (Nakashima et al. 2014; Paul et al. 2012) y en microgravedad simulada por clinorotación en experimentos más antiguos (Hoson 1994).

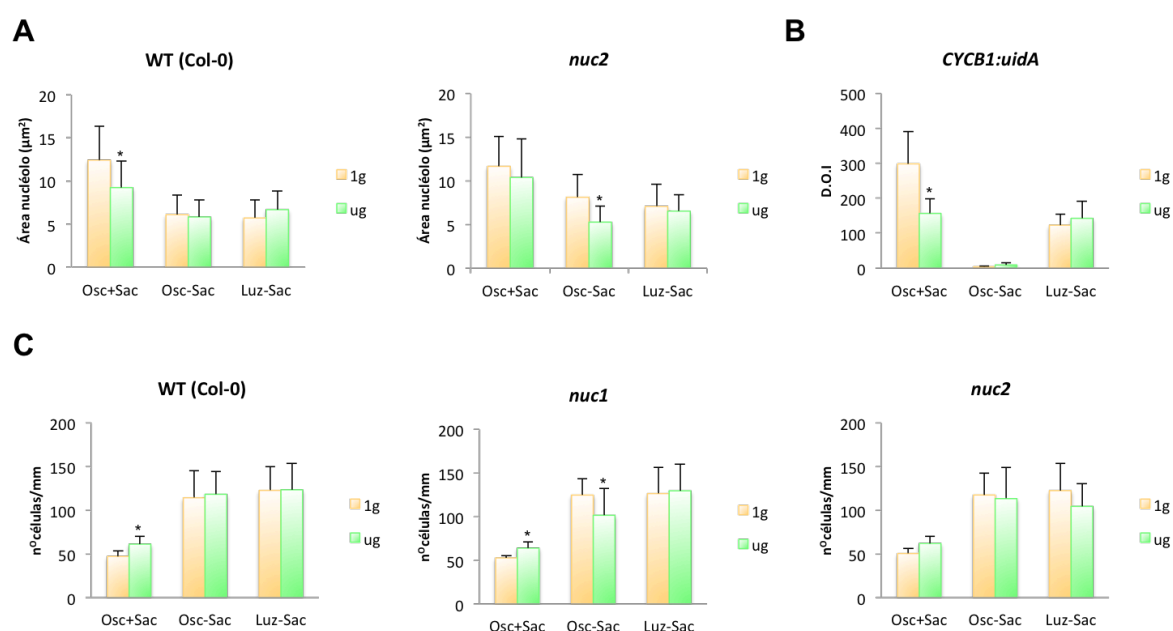
Estas plántulas al crecer en ausencia de luz muestran un crecimiento etiolado, caracterizado por tener hipocótilos muy largos, raíces cortas y células con etioplastos, en vez de cloroplastos con clorofila (Lopez-Juez et al. 2008). Cuando las plantas crecen en oscuridad, el factor de transcripción E2Fc (supresor de ciclo celular) está activado sometiendo a las células, principalmente del hipocótilo, a endociclos que provocan la elongación celular y explicando la gran longitud de éstos (Del Pozo et al. 2002).

Estas plantas tienen raíces tan cortas porque para que se produzca su crecimiento es necesario que la luz incida en los cotiledones (Kircher y Schopfer 2012). Además varios trabajos han demostrado que el crecimiento de la raíz depende únicamente de los azúcares fotosintéticos, ya que el crecimiento y la proliferación de las células que conforman el meristemo radicular (tejido fuente de la raíz) solo es activado en oscuridad al añadir sacarosa al medio o al añadir una fuente de luz que permita realizar la fotosíntesis (Kircher y Schopfer 2012; Nishihama y Kohchi 2013). Esto es debido a que la activación del regulador central del crecimiento y la proliferación celular, TOR, y la expresión de las ciclinas que regulan la transición G1/S, CYCD2/CYCD3, dependen solamente de la presencia de azúcares, ya sea presentes en el medio de cultivo o



procedentes de la fotosíntesis de la parte aérea de la planta (Riou-Khamlichi et al. 2000; Xiong et al. 2013).

En estos trabajos también se establece que el tiempo máximo que los materiales de reserva de la semilla puede sustentar el crecimiento de la planta es como máximo 4-5 días, y en concreto, a los 3 días después de la germinación en oscuridad la raíz cesa de crecer (Kircher y Schopfer 2012; Xiong et al. 2013). Esto podría explicar por qué a los 6 días de crecimiento en oscuridad el efecto de la ausencia de gravedad en los parámetros medidos, tanto en el tallo como en el meristemo radicular, no muestran apenas diferencias con el control 1g, al estar detenido el desarrollo de la planta. Esto ocurre en las tres líneas de *Arabidopsis thaliana* estudiadas (Col-0, *nuc1* y *nuc2*) (FIGURA 98).



**Figura 98. Parámetros comunes medidos en el meristemo radicular de plántulas de *Arabidopsis thaliana*.** Esta figura muestra aquellos parámetros medidos en los tres experimentos realizados en microgravedad simulada en distintas condiciones de crecimiento: oscuridad con sacarosa (Osc+Sac), oscuridad sin sacarosa (Osc-Sac) y luz sin sacarosa (Luz-Sac).

La detención del crecimiento y proliferación celular del meristemo radicular se puede observar claramente al comparar los parámetros celulares comunes medidos en los experimentos realizados en oscuridad con sacarosa, oscuridad sin sacarosa y fotoperiodo sin sacarosa.

El área del nucléolo de las plántulas crecidas sin sacarosa es menor que el de las plántulas crecidas con sacarosa en el medio (FIGURA 98A), lo que indica un cese en el crecimiento celular y en la biogénesis de ribosomas. Varias investigaciones han

mostrado que se produce una disminución en la biogénesis de ribosomas en condiciones de falta de nutrientes o inanición (Boulon et al. 2010).

La expresión del gen de la ciclina B1 es fuertemente reducida en ausencia de sacarosa, algo que también ha sido observado en otros trabajos y que indica un cese en la proliferación celular (Raya-González et al. 2017; Lopez-Juez et al. 2008; Mohammed et al. 2017). En presencia de luz los niveles de expresión de este gen se recuperan parcialmente (FIGURA 98B), lo que apoya la hipótesis de que los azúcares fotosintéticos son necesarios para un buen funcionamiento de las células meristemáticas de la raíz.

Esta comparación también pone de manifiesto que el parámetro utilizado para medir la proliferación celular (nºcélulas/mm) no es comparable entre plántulas de distinta edad (FIGURA 98C) y que en los primeros estadios de desarrollo de la planta, al menos durante los primeros 6 días de crecimiento, el desarrollo de la planta está sustentando principalmente, aunque no exclusivamente, por las reservas de la semilla, como muestran las magnitudes equivalentes de los parámetros estudiados entre las plántulas crecidas con o sin luz en ausencia de sacarosa en el medio.

El área del nucléolo, medida como un indicador de crecimiento celular y del proceso de biogénesis de ribosomas, sufre una disminución en microgravedad simulada y oscuridad en las dos líneas mutantes de nucleolina (*nuc1* y *nuc2*) y, aunque la diferencia no es significativa en la línea silvestre, se observa la misma tendencia. El nucléolo es un sensor de varios tipos de estrés abióticos (daño en el ADN, cambios de temperatura, hipoxia, estrés osmótico, estrés oxidativo, infección viral, falta de nutrientes, etc), los cuales provocan cambios dramáticos en la organización y composición de este orgánulo (Lewinska et al. 2010; Boulon et al. 2010; Mayer y Grummt 2005), por lo que esta disminución en su área puede ser debida al efecto sinérgico de la falta de gravedad junto con la falta de nutrientes.

En el análisis a nivel molecular es muy llamativa la fuerte disminución en el mutante *nuc1* de los intermediarios del procesamiento del pre-RNA (extremo 5'ETS, 25S y extremo 3'ETS). Este mutante carece de la proteína nucleolar nucleolina implicada en el procesamiento del pre-RNA, lo que hace que presente alteraciones en este proceso (Pontvianne et al. 2010, 2007). Además, se ha observado que plántulas de esta línea mutante crecidas en oscuridad en la RPM tienen un nucléolo todavía más desorganizado

que las plantas crecidas en gravedad terrestre, consistiendo en una masa uniforme de gránulos sin ninguna traza de centros fibrilares o componente fibrilar denso (Boucheron-Dubuisson et al. 2016). Las condiciones de crecimiento en oscuridad, sin sacarosa y en microgravedad simulada, pueden hacer que la cantidad de ribosomas sintetizados correctamente sea baja, lo que, al ser detectado por la célula, produzca que la demanda de precursores de pre-RNA aumente considerablemente.

## **5. La luz roja tiene un efecto compensador en el desajuste producido por la microgravedad en oscuridad en la competencia meristemática**

### **5.1. Análisis por qPCR de genes marcadores seleccionados**

El análisis de la expresión de genes (qRT-PCR) marcadores del transporte de auxinas, crecimiento y proliferación celular en las raíces de plántulas de la colección de fitocromos (Ler, *phyA* y *phyB*), en el experimento “Seedling Growth”, muestra un aumento muy fuerte de la expresión de estos genes en microgravedad real en la línea silvestre y el mutante *phyB*. En cambio, en niveles parciales de gravedad simulados en la centrífuga del EMCS se observa una disminución en la expresión de estos marcadores de forma proporcional al nivel de gravedad (diferencias de expresión más marcadas a 0,3g y 0,5g) en las dos líneas mutantes de fitocromos, pero apenas ocurren estas diferencias en la línea silvestre.

A pesar de que existen alteraciones en el patrón de expresión de los genes analizados opuestas entre microgravedad y niveles parciales de gravedad parcial, no se produce el desacople observado en microgravedad, tanto real como simulada, entre crecimiento y proliferación celular (Matía et al. 2010). En cambio, lo que se obtiene es una actividad meristemática coordinada inducida o reprimida.

La recuperación de la competencia meristemática de la raíz por fotoestimulación con luz roja también ha sido descrita en plántulas de los mismos genotipos sometidas a microgravedad simulada en la RPM (Valbuena et al. 2018). En este experimento todas

las plantas crecieron durante los primeros cuatro días con fotoperiodo (16 h luz/8 h oscuridad) y durante los dos últimos días, unas fueron sometidas a fotoestimulación con luz roja y otras se mantuvieron en oscuridad. Las plántulas sometidas a fotoestimulación mostraron una reversión parcial de los efectos observados en las plantas sometidas a oscuridad (efectos similares y en concordancia con experimentos previos realizados en microgravedad y oscuridad) principalmente en la proliferación celular y en menor medida en el crecimiento celular, a nivel molecular y celular.

El efecto estimulador de la luz roja en el crecimiento (biogénesis de ribosomas) y la proliferación celular también ha sido obtenido en el meristemo apical de plantas etioladas de guisante sometidas a un pulso de luz roja. En estos trabajos, las plantas que fueron sometidas a un pulso de luz roja presentaron un mayor índice mitótico, mayores niveles de RNA mensajero de nucleolina y la ciclina B, así como un aumento de las correspondientes proteínas, en comparación con las que no sufrieron ese pulso de luz (Reichler et al. 2001; Tong et al. 1997).

La respuesta observada en las líneas mutantes de fitocromos (*phyA* y *phyB*) a niveles parciales de gravedad, pero no en la línea *wildtype*, pone de manifiesto que una óptima percepción del estímulo de luz roja es suficiente para compensar las alteraciones relacionadas con ambientes de gravedad parcial, como son la Luna y Marte. Esta respuesta diferencial también ha sido observada en el comportamiento fototrópico de estas plantas en la ISS, analizado por el grupo de Kiss en los experimentos TROP-2, SG1 y SG2 (Kiss et al. 2012; Millar et al. 2010). En su estudio, las raíces de las tres líneas de plantas de *Arabidopsis thaliana* mostraron un fototropismo positivo hacia la luz roja inversamente correlacionado con la magnitud del vector gravedad y no observable en condiciones de gravedad terrestre. Este fototropismo está regulado por el fitocromo B, ya que la respuesta de la línea mutante en este fitocromo (*phyB*) fue reducida en comparación con la línea silvestre (Ler).

El distinto tratamiento de preservación tras el periodo de crecimiento (congelación a –80°C o fijación química) de las muestras de la colección de nucleolinas (Col-0, *nuc1* y *nuc2*) crecidas en los experimentos espaciales SG2 y SG3 nos ha permitido abordar el estudio del efecto del ambiente espacial a nivel molecular y celular. La fijación química de las muestras pertenecientes al experimento SG3 nos ha permitido analizar *in situ* la

competencia meristemática de las raíces de estas plantas para conocer el efecto conjunto de la microgravedad y la luz en el crecimiento y proliferación celular en este tejido, ya que es conocido que la mayoría de los fotoreceptores y moduladores de la señal lumínica se expresan en la raíz (Warnasooriya y Montgomery 2011; Mo et al. 2015). Desgraciadamente, la falta de las muestras 1g-oscuridad nos limita la consecución de conclusiones sólidas sobre cómo está afectado el desarrollo de las plantas en esta condición lumínica, pero los resultados obtenidos en el estudio transcriptómico y microscópico apoyan el papel estimulador de la luz roja en el crecimiento y la proliferación celular observado en las plantas de la colección de fitocromos, tanto en microgravedad simulada como real (Valbuena et al. 2018). Respecto de la proliferación celular (nº células/mm), las plantas fotoestimuladas con luz roja y en microgravedad real son las que mayor proliferación presentan, indicando la existencia de un efecto sumatorio en la misma dirección de la falta de gravedad y la luz roja. En cuanto al crecimiento celular (área nucléolo), las mayores áreas de nucléolo marcadas por el anticuerpo anti-fibriliarina son las correspondientes a las plantas crecidas con luz roja, lo que también apoya que este tipo de luz tiene un efecto estimulador en el crecimiento de las plantas.

Así pues, la fotoestimulación con luz roja es capaz de coordinar las ratios de proliferación y crecimiento celular para mantener la competencia meristemática bajo un estrés gravitacional. Este mantenimiento puede ser debido al efecto positivo de la luz roja sobre las señales de transducción de la luz y la gravedad mediadas por auxinas, induciendo un correcto transporte de auxinas en la raíz. De hecho, la línea reportera del transporte de auxinas, DII-VENUS, muestra diferencias en el patrón de distribución de esta hormona entre las plantas fotoestimuladas y las mantenidas en oscuridad y no entre los distintos niveles de gravedad. En plantas de tomate etioladas, sometidas a un pulso de 1h con luz roja, se produce, en el hipocótilo, un aumento del transporte basipétalo de auxinas, manteniéndose los niveles normales de esta hormona en el meristemo apical porque está inducida la biosíntesis de esta fitohormona (Liu et al. 2011).

Los resultados obtenidos en las plantas que estuvieron en oscuridad los dos últimos días de su periodo de crecimiento (6 días) apoyan los resultados obtenidos en niveles de gravedad parcial simulados en la RPM, en cuanto a que el efecto de estos ambientes

en el crecimiento y la proliferación es más marcado que el producido por la microgravedad. En concreto, en las muestras crecidas en el experimento SG3 a un nivel de gravedad de 0,3g el aumento en la proliferación y la reducción en el crecimiento es mayor que en microgravedad real.

## 5.2. Análisis de genoma completo por RNAseq

El análisis transcriptómico a nivel de genoma completo ha revelado que existen categorías funcionales (GO) sobrerrepresentadas en los tres genotipos analizados (Col-0, nuc1 y nuc2) para las dos comparaciones posibles (Red- $\mu g$  vs Red-1g y Dark- $\mu g$  vs Red- $\mu g$ ). Estas categorías de genes comunes o compartidas pertenecen a la respuesta a estímulos y a procesos de biogénesis de la pared celular, principalmente. Genes implicados en la biogénesis de la pared celular también se han encontrado desregulados en las plántulas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo *Landsberg erecta* crecidas durante 6 días en el espacio (experimento TROPI-2) con fotoestimulación respecto del control 1g en Tierra (Correll et al. 2013). Además, esta categoría también ha aparecido afectada en la expresión de sus genes en microgravedad real en plantas de *Arabidopsis thaliana* crecidas tanto en oscuridad como con luz y analizando RNA tanto de plántulas enteras como de hojas, hipocótilos y raíces por separado, al ser comparados sus niveles de expresión con sus correspondientes controles en la Tierra (Kwon et al. 2015; Paul et al. 2017, 2013b, 2012). Aunque los niveles de RNA mensajero no tienen necesariamente que coincidir con los niveles de las correspondientes proteínas, un estudio proteómico ha mostrado una abundancia diferencial en proteínas implicadas en el metabolismo de la pared celular, tanto en hojas como en raíces de plantas de *Arabidopsis thaliana*, entre las que crecieron en la ISS y la Tierra (Fert et al. 2015).

La expresión de los genes relacionados con la pared celular está inducida al comparar microgravedad real con el control 1g en vuelo en presencia de luz roja, pero reprimida al comparar la microgravedad en oscuridad con la fotoestimulación. La rigidez de la pared celular de las plantas es, predominantemente, la responsable de su crecimiento hacia arriba (en contra del vector gravedad) por lo que es razonable esperar que en ausencia de cualquier estímulo (microgravedad real y oscuridad) que dirija su crecimiento su estructura sea modificada. En raíces de plantas de arroz crecidas en el

espacio se describió una disminución en la cantidad de polisacáridos de la pared celular, resultando en un adelgazamiento de ésta (Hoson et al. 2003).

Las categorías de genes implicados en respuestas a estímulos abióticos, como son estímulo lumínico y radiación, o estímulos bióticos, como las hormonas, respuesta a estrés y de defensa también son alteradas en las plántulas analizadas en este trabajo y en los análisis transcriptómicos realizados por otros grupos de investigación en la ISS o en transbordadores en órbita para ambos tratamientos lumínicos (Correll et al. 2013; Kwon et al. 2015; Paul et al. 2012, 2013b, 2005).

El comportamiento de los tres genotipos estudiados es coincidente, en la misma dirección, en las plantas crecidas en oscuridad, pero el del mutante *nuc1* con fotoestimulación con luz roja es opuesto al del WT y *nuc2*. Es decir, las categorías de genes que están inducidas en microgravedad y luz roja en las plantas WT y *nuc2* están reprimidas en el mutante *nuc1* y viceversa. Es especialmente llamativa la inducción de los genes que regulan la fotosíntesis y la respuesta a estímulo lumínico en el mutante *nuc1*. Al no poseer esta línea mutante la proteína nucleolina 1 y tener severos problemas de crecimiento (Pontvianne et al. 2007), podría maximizar la utilización de la señal trópica primaria (luz) en ausencia de gravedad, como se observó en raíces de *Arabidopsis thaliana* crecidas en la ISS con luz (Paul et al. 2013b) y de alguna manera solventar sus problemas de crecimiento y desarrollo.

Las plántulas sometidas durante sus dos últimos días de crecimiento a oscuridad tienen un mayor número de genes desregulados en microgravedad que las plantas fotoestimuladas con luz roja. Estos resultados están de acuerdo con la secuenciación masiva realizada por Paul *et al* 2017, utilizando el RNA procedente de las raíces de plantas de *Arabidopsis thaliana*, donde las que crecieron en oscuridad también mostraron un mayor número de genes alterados a nivel transcripcional que las que lo hicieron, en este caso, con luz ambiental (Paul et al. 2017). Entre este mayor número de genes desregulados se encuentran genes que pertenecen a categorías funcionales sobrerrepresentadas en oscuridad y no en luz roja. La mayoría de los genes que forman parte de estas categorías tienen reprimida su expresión en comparación con  $\mu g$ -luz roja. En concreto, estas categorías reprimidas son categorías relacionadas con procesos

metabólicos (metabolismo de carbohidratos, proteínas y lípidos), biogénesis de ribosomas, división y ciclo celular, crecimiento y desarrollo celular y diferenciación. Una represión en genes implicados en la división celular también ocurrió en el experimento BRIC-16 (plantas crecidas en oscuridad y microarray realizado con el RNA extraído de plantas enteras) (Paul et al. 2012) y una reducción en las proteínas implicadas en la biogénesis de ribosomas se obtuvo del análisis proteómico de una serie de experimentos lanzados a la ISS en la misión STS-129, en las raíces de plantas de 12 días de edad crecidas en presencia de luz (Fert et al. 2015).

El hecho de que, en oscuridad, categorías de genes implicados en funciones vitales e imprescindibles para el desarrollo de la planta, como son la división y el ciclo celular, estén desreguladas y con fotoestimulación con luz roja no lo estén, vuelve a poner de manifiesto el efecto compensador de la luz en ausencia de gravedad en estos procesos.

Las tres líneas de plantas analizadas (Col-0, *nuc1* y *nuc2*) tienen una respuesta a la ausencia de gravedad diferencial, sobre todo en presencia de luz roja (el número de genes compartidos entre los tres genotipos es más bajo que en oscuridad), pero los genes que son diferencialmente expresados en estos genotipos pertenecen a categorías funcionales implicadas en los mismos procesos. Es decir, aunque cada genotipo tiene una respuesta, éstas siguen la misma estrategia de adaptación al ambiente espacial, al igual que lo hacen las distintas partes de una misma planta (raíz, hojas y hipocótilos) para compensar la falta de gravedad (Paul et al. 2013b).

El mutante *nuc2* es la línea con un menor número de genes desregulados en ambas comparaciones, a pesar de no poseer la proteína nucleolina 2, expresada y funcional únicamente bajo condiciones de estrés. Esta línea es capaz de tener una respuesta adaptativa a la ausencia de gravedad modificando la expresión de un número menor de genes que el genotipo silvestre y de alcanzar un crecimiento equivalente. Esta misma respuesta ha sido observada en otras dos líneas mutantes de *Arabidopsis thaliana*, *WS* y *phyD* utilizadas en el experimento CARA desarrollado en la Estación Espacial Internacional (Paul et al. 2017), por lo que esta mutación podría ser una ventaja a la hora de adaptarse a un ambiente de ingravidez respecto a las plantas silvestres. Se puede interpretar del compartamiento de estos dos mutantes que la respuesta del fenotipo silvestre es exagerada, en un intento por localizar un vector gravedad que no



consigue localizar, mientras que en el caso de los mutantes menos sensibles, esa respuesta atenuada constituye una ventaja. Esto sería un hecho a tener en cuenta para obtener variedades de plantas usadas en los Sistemas de Soporte Vital.

La falta de las muestras correspondientes al control 1g en vuelo en oscuridad dificulta la interpretación de los resultados, al igual que la falta, en ambas condiciones lumínicas, de un control 1g llevado a cabo en la Tierra. La ausencia de este último no nos permite conocer si los efectos observados entre las muestras crecidas en microgravedad real y el control en vuelo se deben a la falta de gravedad *per se* o a efectos indirectos del vuelo espacial, como son la radiación, la ausencia de convección de gases o fuerzas mecánicas de la centrifugación para simular la gravedad terrestre. La importancia de ambos controles lo demostró el análisis transcripcional realizado con plantas del experimento TROPI-2, al encontrar un gran número de genes expresados diferencialmente entre el control en Tierra y el control en vuelo (ver NOTA) (Correll et al. 2013).

En todo caso, la utilización de un *hardware* espacial altamente desarrollado para el control de múltiples condiciones de crecimiento (temperatura, humedad, airación, etileno) como es el EMCS, minimiza los efectos producidos por las condiciones ambientales del espacio distintas de la falta de gravedad, como ocurrió con la utilización del hardware BRIC, en el cual las alteraciones observadas en las plantas se debían principalmente al ambiente de hipoxia sufrido durante el crecimiento dentro de este dispositivo (Kwon et al. 2015).

*NOTA: Es preciso mencionar que este experimento control 1g en Tierra está previsto en la programación del experimento "Seedling Growth", pero las circunstancias impuestas por las agencias espaciales han retrasado su realización hasta un momento fuera del marco temporal de la realización de esta Tesis Doctoral. Puesto que los datos obtenidos del experimento "Seedling Growth 2" cuentan con un control 1g en vuelo con el que comparar los efectos de la microgravedad y de la fotoactivación con luz roja, hemos optado por incluir estos datos en la presente memoria, con la firme convicción de que cumplen con todos los requerimientos de rigor experimental necesarios para obtener conclusiones sólidas a partir de ellos. Sin embargo, somos conscientes de que las conclusiones obtenidas a partir de ellos, si bien están rigurosamente formuladas, estarán sujetas a una cierta matización en el futuro, una vez se posean los datos del control terrestre.*

## 6. El efecto de la radiación crónica y de baja dosis es atenuado por la microgravedad simulada

Las plántulas de las tres líneas de *Arabidopsis thaliana* (Col-0, *nuc1* y *nuc2*) sometidas a radiación durante todo su periodo de crecimiento en microgravedad simulada (dosis crónica) en una dosis equivalente a la existente en la ISS (dosis baja de 0,4 mGy/día), experimentan efectos similares a los que produce esta radiación a gravedad terrestre (1g), tanto en un régimen lumínico de fotoperiodo, como en oscuridad.

En presencia de radiación ocurre un aumento en la longitud de sus tallos, en comparación con plántulas crecidas en las mismas condiciones, pero sin ser irradiadas. Esto mismo se ha descrito que ocurre en plántulas de *Arabidopsis thaliana* de 7 días de edad sometidas a dosis equivalentes de radiación, en las cuales el peso seco de sus tallos fue mayor que en las plantas no sometidas a radiación (Biermans et al. 2015). Además, en otro experimento, plantas de esta misma especie sometidas a radiación durante un ciclo vital entero solo sufrieron una disminución en el peso seco de sus tallos a altas dosis de radiación (Vandenhove et al. 2010).

Este aumento en la longitud del tallo producido por la radiación puede asociarse a una optimización de la fotosíntesis por un aumento en la eficacia del fotosistema II (PSII) y a una disminución en la disipación del calor que haría que la división celular aumente, lo cual también, está en concordancia con el aumento de la expresión del gen *CKS1* (regulador positivo de CDKs y tomado como marcador de la mitosis) obtenido en tallos de plántulas de *Arabidopsis thaliana* sometidas a una radiación del mismo orden que el utilizado en los experimentos de este trabajo (Biermans et al. 2015; Vanhoudt et al. 2014).

En cambio, la longitud de las raíces en las plantas irradiadas en gravedad terrestre es menor que en las plantas no sometidas a radiación, siendo este efecto más marcado en las plantas crecidas en oscuridad. El peso seco de raíces de plántulas de *Arabidopsis thaliana* sometidas a radiación fue menor incluso después de 54 días de ser irradiadas y esta misma reducción también ocurrió en plantas de *Helianthus annuus* expuestas a radiación con  $^{60}\text{Co}$  (Vandenhove et al. 2010; Veronica De Micco et al. 2011). Este resultado está acompañado por la disminución en la proliferación y crecimiento de las células del meristemo radicular, lo que indica que este tejido es sensible a este tipo de

estímulo, como también lo demostró la disminución en la actividad de enzimas encargadas de la escisión de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en las raíces y no en el tallo, determinándose que los tejidos meristemáticos son los tejidos más sensibles (Vanhoudt et al. 2014).

El efecto conjunto de la radiación y la microgravedad, ha sido poco estudiado pero se han descrito efectos aditivos, sinérgicos o antagónicos (Kiefer y Pross 1999). En dos estudios en los que se analiza el efecto de la microgravedad simulada por un clinostato 2D en la respuesta adaptativa a la radiación y el efecto de la radiación en células vecinas o alejadas del tejido irradiado, se ha descrito que al someter plántulas de *Arabidopsis thaliana* a microgravedad, tras ser irradiadas, la ausencia de gravedad es capaz de volver los parámetros analizados a niveles iguales a los obtenidos en las muestras control (no irradiadas ni sometidas a microgravedad) (Deng et al. 2017; T. Wang et al. 2015). Es decir, la microgravedad simulada produce un menor aumento en la frecuencia de recombinación homóloga (HRF), disminuye la producción de ROS y aumenta el transporte de auxinas, retornando estos parámetros a los mismos valores que en las muestras control. Esto es lo mismo que ocurre con los parámetros celulares estudiados en el meristemo radicular ( $n^{\circ}$ células/mm, área del nucléolo y expresión del gen *CYCB1;1*), especialmente en las plántulas crecidas en oscuridad y en el área del nucléolo, la cual incluso aumenta en la línea mutante *nuc2* en las muestras irradiadas.

Este efecto conjunto de la radiación y la gravedad podría explicar las escasas diferencias encontradas al estudiar el efecto de la gravedad en presencia y ausencia de radiación y también apoya la hipótesis de que, al no poder realizar la fotosíntesis, las plantas responden de forma distinta a los estímulos externos.

En base a los resultados obtenidos, las dosis de radiación a la que han sido sometidas las plantas de este experimento no impiden el crecimiento de ninguna de las líneas de *Arabidopsis thaliana* analizadas durante sus 6 primeros días de vida. Las plantas son organismos que por sus características fisiológicas son más resistentes a la radiación que los animales. En las plantas, al ser organismos multicelulares, la presencia de tejidos multicapa en la superficie de los órganos controla e impide el daño producido por agentes penetrantes. Además, los compuestos fenólicos que forman parte de sus

cutículas y pared celular les confieren capacidad de pantalla y por tanto, radorresistencia (Arena et al. 2014a; Kranz et al. 1994; Nagata et al. 1999). Recientes estudios han demostrado que la radiación induce en plantas un aumento en la actividad de enzimas antioxidantes, una activación de la polimerasa poli-(ADP-ribosa) (PARPs) que reconoce y repara daños en el DNA y una sobreproducción de compuestos fenólicos, que mejoran su resistencia a la radiación (Arena et al. 2013, 2014b).

En las plantas el tamaño del genoma y el número de cromosomas (poliploidía) también influye en su resistencia a la radiación. En este sentido, se ha determinado en experimentos anteriores que *Arabidopsis thaliana* es una especie bastante resistente a la radiación, una característica apoyada por el hecho de que, para producir una severa reducción en su crecimiento, fue necesaria una dosis de 1.700 mGy/h (Sparrow 1963; Biermans et al. 2015; Vandenhove et al. 2010).

## 7. Contribución de los resultados obtenidos a la exploración espacial

Los resultados presentados en este trabajo muestran que la optimización de las condiciones de crecimiento es muy importante para el buen crecimiento y desarrollo de las plantas en ambientes de gravedad reducida, la superación del estrés gravitatorio y la eventual adaptación de las plantas a este medio ambiente. En especial, en los experimentos espaciales, la utilización de instalaciones o dispositivos, que controlen la temperatura, la humedad, la iluminación, el intercambio de gases y la concentración de etileno en el ambiente es determinante para un correcto desarrollo de las plantas, aunque crezcan en magnitudes de gravedad menores (microgravedad o niveles parciales) a la existente en la Tierra ( $1g$ ). La importancia del *hardware* utilizado se ha puesto de manifiesto en varios experimentos realizados en la ISS, en los cuales los efectos observados en semillas y plantas eran debidos a limitaciones del control de las condiciones de crecimiento de éstos (Kwon et al. 2015; Link et al. 2014) y eliminados cuando esas limitaciones eran solventadas (Ferl y Paul 2016; Paul et al. 2013b).

La instalación utilizada en el experimento “Seedling Growth”, el EMCS, controla todos estos parámetros (temperatura, humedad, iluminación, intercambio de gases,

eliminación de etileno) y además posee dos centrífugas que permiten obtener diferentes niveles de gravedad, incluido el equivalente al de la Tierra ( $1g$ ), , además de poder eliminar otros efectos no deseados de un experimento espacial, como es la radiación cósmica, todo ello para conocer del modo más fiable el efecto de la ausencia de gravedad en el desarrollo de las plantas (Kiss 2015; Vandenbrink y Kiss 2015).

La utilización de este dispositivo nos ha permitido estudiar más a fondo el crecimiento de las plantas y, en concreto, la alteración y eventual restauración de la competencia meristemática en los primeros días de su desarrollo, en condiciones de cultivo mucho más controladas que en el experimento “ROOT”. La comparación de los parámetros indicativos de proliferación y crecimiento celular, medidos en las plantas *wild type* de ambos experimentos espaciales (“ROOT “ y “Seedling Growth”) indican que cuanto mayor es el control de las condiciones de crecimiento, menor es el efecto adverso de la microgravedad en el desarrollo temprano de estas plantas (TABLA 25).

Comparativa entre los experimentos espaciales "ROOT" y "Seedling Growth"		
	ROOT	Seedling Growth
<b>Parámetros ambientales controlados</b>		
Temperatura	No	22 °C
Humedad relativa	No	80%
Atmósfera controlada ( <i>airflow</i> )	No	Si
Eliminación etileno	No	Si
Iluminación	No	Si
Medio suplementado con sacarosa	Si	No
<b>Parámetros analizados (cambios significativos respecto al control 1g)</b>		
Longitud raíz	+++	---
Nº células/mm	+++	+++ (luz roja)
Área nucléolo ( $\mu\text{m}^2$ )	---	= (luz roja)
Análisis transcripcional (RNAseq)		Menor número de genes desregulados con fotoestimulación con luz roja que en oscuridad (crecimiento y proliferación celular no alterados)
Patrón distribución auxinas (DII-VENUS)		No alterado
<b>Conclusión principal</b>	Desacople entre crecimiento y proliferación celular	El desacople entre crecimiento y proliferación celular se compensa mediante la luz roja

**Tabla 25. Comparación de los experimentos espaciales "ROOT" y "Seedling Growth" para la línea silvestre Col-0.** En la tabla se indican los parámetros ambientales controlados por los dispositivos o *hardware* utilizados para cada experimento, los cambios significativos obtenidos para cada uno de los parámetros analizados para estudiar el crecimiento y desarrollo de las plantas (competencia meristemática de la raíz) y la principal conclusión extraída de cada uno de ellos.

La importancia del ambiente gaseoso es resaltante debido a que, en microgravedad las condiciones termodinámicas que dan lugar a las corrientes convectivas de aire cerca de la superficie de los tejidos de la planta están alteradas, lo que conlleva a un aumento en la resistencia de la capa límite, y por tanto, a una reducción del potencial de intercambio de gases (Porterfield 2002). La limitada contribución de la convección en el intercambio gaseoso junto con la influencia insignificante de la difusión, en este proceso, provocan regiones de hipoxia que conllevan, en las plantas crecidas en microgravedad, a una menor maduración del embrión, a tejidos más jóvenes y raíces más cortas (Kuang et al.

2005; Briarty y Maher 2004). Este fenotipo es manifestado en las plantas crecidas durante el experimento SG3, como lo demuestra la generalizada menor longitud de sus raíces, en comparación con las plántulas pertenecientes al experimento SG2, en el que el sistema de renovación de aire (*airflow*) funcionó correctamente.

La luz es otro factor ambiental de gran importancia para el buen desarrollo de las plantas en ambientes de gravedad reducida, como demuestran los experimentos presentados en este trabajo, en los que la iluminación de las plantas es capaz de sustituir a la gravedad como factor ambiental orientador del crecimiento, y en consiguiente, atenuar o suprimir los efectos del estrés gravitatorio sobre las funciones celulares objeto de este estudio. Además de que la iluminación de las plantas restaurara el desacople entre proliferación y crecimiento observado en oscuridad, el estímulo con luz roja produjo un aumento en ambos procesos, obteniéndose una competencia meristemática “acelerada”. El concepto de competencia meristemática “acelerada” (aumento de los parámetros de crecimiento y proliferación celular respecto del control  $1g$ ) y competencia meristemática “desacelerada” (disminución de los parámetros de crecimiento y proliferación celular respecto del control  $1g$ ) es definido en el artículo de Valbuena *et al*, en donde la restauración de la competencia meristemática por la iluminación con luz roja puede ocurrir por una coordinación del crecimiento y la proliferación celular, resultando en un aumento de ambos procesos celulares o en una disminución de éstos (Valbuena et al. 2018).

Los experimentos realizados a niveles parciales de gravedad, tanto en las instalaciones de ESTEC como en las centrífugas del EMCS, nos han permitido determinar que el valor umbral de percepción de la gravedad está comprendido entre  $0,17g$ - $0,38g$ . En este trabajo, un valor de gravedad equivalente al presente en Marte ( $0,38g$ ) es suficiente para que los parámetros indicativos de crecimiento y proliferación celular tengan valores similares o no difieran de los obtenidos en la condición control. La hipótesis de que el nivel de gravedad presente en Marte es suficiente para que la gravedad *per se* no sea un problema importante para el desarrollo de las plantas también está apoyada por experimentos anteriores, como es el experimento TROPI-2, el cual determina que niveles de gravedad superiores a  $0,3g$  son suficientes para que la respuesta fototrópica

de tallos y raíces fotoestimulados con luz roja y azul sea igual a la respuesta de las plantas que crecen en la condición control  $1g$  (Kiss et al. 2012).

El desacople entre proliferación y crecimiento celular o el efecto más marcado en estos dos procesos, obtenido en el nivel de gravedad equivalente al presente en la superficie lunar ( $0,17g$ ) puede ser debido a que la contribución de los dos componentes del vector gravedad, dirección (gravitropismo) y magnitud (gravirresistencia), es diferente (Herranz y Medina 2014). Es decir, es posible que el umbral de detección de la dirección del vector gravedad sea suficiente pero no su magnitud, por lo que la planta recibe información contradictoria y su respuesta es un desajuste aún más marcado que en microgravedad.

Creemos que este trabajo es una aportación importante para el correcto crecimiento y desarrollo de las plantas en ambientes de gravedad reducida, algo totalmente esencial porque éstas forman un parte de los llamados Sistemas de Soporte Vital, necesarios para la supervivencia humana en las futuras expediciones a la Luna y a Marte, o incluso en los viajes espaciales de largo recorrido a exoplanetas. Los experimentos presentados en esta memoria determinan cuales son las condiciones óptimas de crecimiento de las plantas, en cuanto, a aporte de nutrientes (composición del medio de cultivo), iluminación, temperatura, humedad y composición gaseosa del ambiente. También es uno de los primeros trabajos que ha estudiado el efecto conjunto de la radiación y falta de gravedad, que sufrirían las plantas en estas expediciones espaciales, sobre su crecimiento y desarrollo.

Por último, debemos resaltar que damos respuesta, por primera vez, a preguntas básicas para el cultivo de plantas en ambientes no terrestres, como cuál es el umbral de gravedad necesario para que las plantas crezcan y se desarrollen con normalidad, cuáles son los efectos fisiológicos de niveles parciales de gravedad y si estos efectos son los mismos que los producidos por la microgravedad.

La respuesta a todas estas cuestiones es muy importante para el asentamiento de colonias humanas en la Luna y Marte y su exploración, pero también pueden utilizarse para una mejor comprensión de la fisiología vegetal y de sus procesos celulares básicos, y así, aumentar el rendimiento y mejorar los cultivos agrícolas, aquí en la Tierra.





# CONCLUSIONES

## Conclusions

1. Studies performed in conditions of gravity levels intermediate between  $0g$  and  $1g$  have shown that the threshold value for the normal perception of the gravity vector and for the generation of a response in our experimental model is comprised between  $0.17g$  and  $0.38g$ . This results from the oriented growth of plants grown at levels equivalent to those present on Mars surface ( $0.38g$ ) in the space experiment "Seedling Growth 3" and from the persistence of the meristematic competence in plants grown at this level of simulated partial gravity in the RPM. These data indicate that the gravity present on Mars is sufficient for an adequate and oriented development of plants.
2. The gravity level present in the lunar surface ( $0.17g$ ) produces a marked effect in the decoupling between cell growth and cell proliferation in meristematic cells, which is even stronger than the effect detected under real and simulated microgravity. This is probably due to the contradictory signal by the different gravity perception pathways, such as gravitropism and graviresistance.
3. The two technological procedures developed to simulate partial gravity levels on Earth, by modifying the regular mode of RPM operation ( $RPM^{HW}$  and  $RPM^{SW}$ ) are valid to achieve this goal. This was corroborated by analyzing the decoupling between cell proliferation and growth in the root meristem of plants grown in the same experimental conditions as previously used in the "Root" space experiment and complementary (medium supplemented with sucrose in darkness). However, some differences observed between the two simulation techniques make necessary the validation of these experiments in real conditions of partial gravity.
4. Unilateral illumination with a photoperiod regime, which allows photosynthesis and directs the growth towards the light source, is sufficient to counteract the effects caused in plant growth by the lack of gravity, in darkness. Plants grown in the RPM with photoperiod show an equivalent growth and development as the

1g control, as inferred from the cellular parameters indicative of cell growth and proliferation. Nevertheless, some alterations in the expression of regulatory genes of these processes and in ribosome biogenesis, particularly in 45S pre-rRNA processing, are produced.

5. The lack of sucrose and light produces a stress on the developing seedling that is capable of masking the gravitational stress caused by the microgravity environment. This happens despite the main source of energy in seedlings during the early development is constituted by the stored seed reserves.
6. Photostimulation with red light activates cell growth and proliferation, as indicated by parameters recorded on plants grown in the space experiment “Seedling Growth”, photostimulated during the last two days of their growth. In addition, in photostimulated plants of the wild type and nucleolin mutant lines (*nuc1* and *nuc2*), a lower number of genes whose expression is deregulated by microgravity is obtained, in comparison with plants grown in darkness during the same period. Functional gene categories of genes involved in the cell cycle or in ribosome biogenesis are not included among these deregulated genes.
7. Overactivation of mechanisms of stress response against a situation that the plant is unable of mitigating, such as the lack of gravitational stimulus, may be detrimental. This can be the case for the *nuc2* mutant line, which does not express the nucleolin variant for stress response (NUC2 protein), which is capable of adapting to a microgravity environment by changing the expression of a smaller number of genes than the wild type, showing growth phenotypes equivalent to the latter line in all the experimental conditions studied. Therefore, a mutant line with this attenuated response may constitute an advantage to be taken into account when selecting the most productive plant varieties for Life Support Systems.

8. The radiation dose received by plants during their growth in the International Space Station does not prevent their correct development in the early stages. We have observed that this radiation even acts as an attenuating component of the effects produced by gravitational stress, as shown by the equivalent values in the parameters studied between the control samples (1g) and those subjected to simulated microgravity (RPM).
9. The accomplishment of the space experiments included in this work has involved technological and methodological developments, which have been validated by different tests. This has resulted in significant advances in the reliability of the performance of plant experiments in space. In particular, this has allowed the last phase of the “Seedling Growth” experiment, SG3, to be successfully performed. The amount of plant material obtained, with high germination rates, was sufficient to make possible molecular analyses with global transcriptomic methods (RNAseq). Moreover, the quality of fixation, using the device developed for this procedure (FixBox), was adequate to allow the ultrastructural analysis of cellular subcomponents, such as the nucleolus, by transmission electron microscopy, as well as the quantity and in situ distribution of regulatory proteins of the cell cycle and the ribosome biogenesis by confocal microscopy.

## Conclusiones

1. Los estudios realizados en condiciones de niveles de gravedad intermedios entre  $0g$  y  $1g$  han mostrado que el valor umbral para la percepción con normalidad del vector gravedad y para la generación de una respuesta al mismo en nuestro modelo experimental está comprendido entre  $0,17g$  y  $0,38g$ . Esto viene dado por el crecimiento orientado de las plantas crecidas en niveles equivalentes a los presentes en la superficie de Marte ( $0,38g$ ) en el experimento espacial “Seedling Growth 3” y por la conservación de la competencia meristemática en las plantas crecidas en ese nivel de gravedad parcial simulada en la RPM. Estos datos indican que la gravedad presente en Marte es suficiente para que se produzca un desarrollo adecuado y orientado de las plantas.
2. El nivel de gravedad presente en la superficie lunar ( $0,17g$ ) produce un efecto marcado en el desacople entre crecimiento y proliferación celular en células meristemáticas, incluso mayor al observado en microgravedad real y simulada. Esto es debido, probablemente, a la percepción de señales contradictorias mediante las diferentes rutas que detectan estímulos gravitatorios, tales como el gravitropismo y la gravirresistencia.
3. Los dos procedimientos tecnológicos desarrollados para simular niveles parciales de gravedad en Tierra, por modificación del modo regular de funcionamiento de la RPM (RPM<sup>HW</sup> y RPM<sup>SW</sup>) son válidos para conseguir este objetivo. Esto se ha corroborado analizando el desacople entre proliferación y crecimiento celular en el meristemo radicular de plantas crecidas en las mismas condiciones experimentales que en el experimento espacial “Root” y complementarios (medio suplementado con sacarosa y oscuridad). Sin embargo, se han observado diferencias entre las dos técnicas de simulación, reforzando la necesidad de validación de estos experimentos en condiciones reales de gravedad parcial.

4. La iluminación unilateral con un régimen de fotoperiodo, que permite realizar la fotosíntesis y orientar el crecimiento hacia la fuente de luz, es suficiente para contrarrestar significativamente los efectos causados en el crecimiento de las plantas por la falta de gravedad, en oscuridad. Las plantas crecidas en la RPM con fotoperiodo presentan un crecimiento y desarrollo equivalentes al control 1g, como muestran los parámetros celulares indicadores de crecimiento y proliferación celular. Sin embargo, se producen alteraciones en la expresión de genes reguladores de estos procesos y en la biogénesis de ribosomas, particularmente en el procesamiento del pre-rRNA 45S.
5. La ausencia de luz y de sacarosa provoca un estrés sobre la plántula en crecimiento que consigue enmascarar el estrés gravitatorio producido por el ambiente de microgravedad. Esto ocurre a pesar de que la fuente de energía principal de las plántulas durante los primeros días de su desarrollo es la reserva almacenada en la semilla.
6. La fotoestimulación con luz roja activa el crecimiento y la proliferación celular, como indican los parámetros medidos sobre plantas crecidas en el experimento espacial "Seedling Growth", fotoestimuladas durante los dos últimos días de su crecimiento. Además, en plantas fotoestimuladas de genotipo silvestre y mutantes para los dos genes de nucleolinas (*nuc1* y *nuc2*) se obtiene un menor número de genes con expresión desregulada por la microgravedad en comparación con las plantas crecidas en oscuridad durante el mismo período. Entre estos genes no están incluidas categorías funcionales implicadas en el ciclo celular ni en la biogénesis de ribosomas.
7. La sobreactivación de mecanismos de respuesta a estrés ante una situación que la planta no puede mitigar, como es la falta del estímulo gravitatorio, puede ser perjudicial. Este puede ser el caso de la línea mutante *nuc2*, que no expresa la variante de respuesta a estrés de la proteína nucleolina (proteína NUC2), la cual es capaz de adaptarse a un ambiente de microgravedad cambiando la expresión de un menor número de genes que la línea silvestre y con fenotipos de crecimiento equivalentes a esta última en todas las condiciones experimentales

estudiadas. Una línea mutante con esa respuesta atenuada puede ser una ventaja a tener en cuenta a la hora de elegir variedades de plantas más productivas para los Sistemas de Soporte Vital.

8. La cantidad de radiación que reciben las plantas durante su crecimiento en la Estación Espacial Internacional no impide su correcto desarrollo en las etapas tempranas. Hemos observado que esta radiación incluso actúa como un componente atenuador de los efectos producidos por el estrés gravitatorio, como muestran los valores equivalentes en los parámetros estudiados entre las muestras control ( $1g$ ) y las sometidas a microgravedad simulada (RPM).
9. La realización de los experimentos espaciales incluidos en este trabajo ha incluido desarrollos tecnológicos y metodológicos que se han validado mediante diferentes pruebas o tests. Esto ha supuesto avances significativos en la fiabilidad de la ejecución de experimentos con plantas en el espacio. En particular, han permitido que la última fase del experimento “Seedling Growth”, SG3, se haya desarrollado con éxito. La obtención de material vegetal con altas tasas de germinación fue suficiente para poder realizar análisis a nivel molecular, utilizando métodos transcriptómicos globales (RNAseq). La calidad de la fijación conseguida con el dispositivo desarrollado para ello (FixBox) fue adecuada para analizar la ultraestructura de los subcomponentes celulares, como el nucléolo, por microscopía electrónica de transmisión, así como la cantidad y distribución *in situ* de proteínas reguladoras del ciclo celular y la biogénesis de ribosomas mediante microscopía confocal.





# **BIBLIOGRAFÍA**

## Bibliografía

- Abas, L., Benjamins, R., Malenica, N., Paciorek, T., Wiśniewska, J., Moulinier-Anzola, J.C., Sieberer, T., Friml, J. y Luschnig C. 2006. «Intracellular trafficking and proteolysis of the Arabidopsis auxin-efflux facilitator PIN2 are involved in root gravitropism.» *Nature cell biology* 8 (3):249-56. <https://doi.org/10.1038/ncb1369>.
- Abou-Ellail, M., Cooke, R. y Sáez-Vásquez J. 2011. «Variations on a team: Major and minor variants of arabidopsis thaliana rDNA genes». *Nucleus* 2 (4):294-99. <https://doi.org/10.4161/nucl.2.4.16561>.
- Ahn, C. S., Ahn, H.K. y Pai, H.S. 2015. «Overexpression of the PP2A regulatory subunit Tap46 leads to enhanced plant growth through stimulation of the TOR signalling pathway». *Journal of Experimental Botany* 66 (3):827-40. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru438>.
- Alonso, J. M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Cristina C. Meyers,1 Holly Parker,1 Lance Prednis,1 Yasser Ansari,1 Nathan Choy,1 Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D.E., Marchand, T., Risseuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W.L., Berry, C.C. y Ecker, J.R. 2003. «Genome-wide insertional mutagenesis of Arabidopsis thaliana». *Science* 301 (5633):653-57. <https://doi.org/10.1126/science.1086391>.
- Araki, S., Ito, M., Soyano, T., Nishihama, R. y Machida, Y. 2004. «Mitotic cyclins stimulate the activity of c-Myb-like factors for transactivation of G2/M phase-specific genes in tobacco.» *The Journal of biological chemistry* 279 (31). American Society for Biochemistry and Molecular Biology:32979-88. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403171200>.
- Arena, C., De Micco, V., Aronne, G., Pugliese, M., Virzo De Santo, A. y De Maio, A. 2013. «Response of Phaseolus vulgaris L. plants to low-let ionizing radiation: Growth and oxidative stress». *Acta Astronautica* 91. Elsevier:107-14. <https://doi.org/10.1016/j.actaastro.2013.05.013>.
- Arena, C., De Micco, V., Macaeva, E. y Quintens, R. 2014a. «Space radiation effects on plant and mammalian cells». *Acta Astronautica* 104 (1). Elsevier:419-31. <https://doi.org/10.1016/j.actaastro.2014.05.005>.
- Arena, C., De Micco, V. y De Maio, A. 2014b. «Growth alteration and leaf biochemical responses in Phaseolus vulgaris exposed to different doses of ionising radiation». *Plant Biology* (16):194-202. <https://doi.org/10.1111/plb.12076>.
- Barbosa, I.C.R., Hammes, U.Z. y Schwechheimer, C. 2018. «Activation and Polarity Control of PIN-FORMED Auxin Transporters by Phosphorylation». *Trends in Plant Science* (1666):1-16. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.03.009>.
- Barneche, F., Steinmetz, F. y Echeverria, M. 2000. «Fibrillarin genes encode both a conserved nucleolar protien and a novel small nucleolar RNA involved in ribosomal RNA methylation in Arabidopsis thaliana». *Journal of Biological Chemistry* 275 (35):27212-20. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002996200>.
- Baserga, R. 2007. «Is cell size important?» *Cell Cycle* 6 (7):814-16. <https://doi.org/10.4161/cc.6.7.4049>.
- Beemster, G. T. S. y Baskin, T.I. 1998. «Analysis of cell division and elongation underlying the developmental acceleration of root growth in Arabidopsis thaliana.» *Plant physiology* 116 (4):1515-26. <https://doi.org/10.1104/pp.116.4.1515>.

- Berckmans, B. y De Veylder, L. 2009. «Transcriptional control of the cell cycle». *Current Opinion in Plant Biology* 12 (5):599-605.  
<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.07.005>.
- Biermans, G., Horemans, N., Vanhoudt, N., Vandenhove, H., Saenen, E., Van Hees, M., Wannijn, J., Vangronsveld, J. y Cuypers, A. 2015. «Arabidopsis thaliana seedlings show an age-dependent response on growth and DNA repair after exposure to chronic  $\gamma$ -radiation». *Environmental and Experimental Botany* 109. Elsevier B.V.:122-30. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.09.001>.
- Blilou, I., Frugier, F., Folmer, S., Serralbo, O., Willemsen, V., Wolkenfelt, H., Eloy, N.B., Ferreira, P.C.G., Weisbeck, P. y Scheres, B. 2002. «The arabidopsis HOBbit gene encodes a CDC27 homolog that links the plant cell cycle to progression of cell differentiation.pdf». *Genes & Development* (16):566-75.  
<http://www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.013847>.
- Blilou, I., Xu, J., Wildwater, M., Willemsen, V., Paponov, I., Friml, J., Heidstra, R., Aida, M., Palme, K. y Scheres, B. 2005. «The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots.» *Nature* 433 (7021):39-44.  
<https://doi.org/10.1038/nature03184>.
- Boniotti, M.B. y Gutierrez, C. 2001. «A cell-cycle-regulated kinase activity phosphorylates plant retinoblastoma protein and contains, in Arabidopsis, a CDKA/cyclin D complex». *Plant Journal* 28 (3):341-50.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-3113X.2001.01160.x>.
- Borst, A. G., y Van Loon, J.J.W.A. 2009. «Technology and developments for the random positioning machine, RPM». *Microgravity Science and Technology* 21 (4):287-92.  
<https://doi.org/10.1007/s12217-008-9043-2>.
- Boucheron-dubuisson, E., Manzano, A.I., Le Disquet, I., Matía, I., Sáez-vasquez, J., Van Loon, J.J.W.A., Herranz, R., Carnero-diaz, E. y Medina, F.J. 2016. «Functional alterations of root meristematic cells of Arabidopsis thaliana induced by a simulated microgravity environment». *Journal of Plant Physiology* (207):30-41.  
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.09.011>.
- Boulon, S., Westman, B.J., Hutten, S., Boisvert, F.M. y Lamond, A.I. 2010. «The Nucleolus under Stress». *Molecular Cell* 40 (2):216-27.  
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.024>.
- Bouvet, P., Diaz, J.J., Kindbeiter, K., Madjar, J.J. y Almaric, F. 1998. «Nucleolin Interacts with Several Ribosomal Proteins through Its RGG Domain». *The Journal of Biological Chemistry* 273 (30):19025-29.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.273.30.19025>.
- Briarty, L.G. y Maher, P. 2004. «Reserve Utilization in Seeds of Arabidopsis thaliana Germinating in Microgravity». *International Journal of Plant Sciences* 165 (4):545-51. <https://doi.org/10.1086/386379>.
- Briggs, W.R. y Olney, M.A. 2001. «Photoreceptors in Plant Photomorphogenesis to Date. Five Phytochromes, Two Cryptochromes, One Phototropin, and One Superchrome». *Plant Physiology* 125 (1):85-88. <https://doi.org/10.1104/pp.125.1.85>.
- Briggs, W.R. y Lin, C.T. 2012. «Photomorphogenesis-from one photoreceptor to 14: 40 years of progress». *Molecular Plant* 5 (3):531-32.  
<https://doi.org/10.1093/mp/sss059>.
- Brinckmann, E. 1999. «Spaceflight opportunities on the ISS for plant research - The ESA perspective». *Advances in Space Research* 24 (6):779-88.  
[https://doi.org/10.1016/S0273-1177\(99\)00413-5](https://doi.org/10.1016/S0273-1177(99)00413-5).
- Brinckmann, E. 2005. «ESA hardware for plant research on the International Space

- Station». *Advances in Space Research* (36):1162-66.  
<https://doi.org/10.1016/j.asr.2005.02.019>.
- Brudler, R., Hitomi, K., Daiyasu, H., Toh, H., Kucho, K.I., Ishiura, M., Kanehisa, M., Roberts, V.A., Todo, T., Tainer, J.A. y Getzoff, E.D. 2003. «Identification of a new cryptochrome class: Structure, function, and evolution». *Molecular Cell* 11 (1):59-67. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00008-X](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00008-X).
- Brungs, S., Egli, M., Wuest, S.L., Christianen, P.C.M., Van Loon, J.J.W.A., Anh, T.J.N. y Hemmersbach, R. 2016. «Facilities for Simulation of Microgravity in the ESA Ground-Based Facility Programme». *Microgravity Science and Technology* 28 (3):191-203. <https://doi.org/10.1007/s12217-015-9471-8>.
- Brunoud, G., Wells, D.M., Oliva, M., Larrieu, A., Mirabet, V., Burrow, A.H., Beeckman, T., Kepinski, S., Trass, J., Bennett, M.J. y Vernous, T. 2012. «A novel sensor to map auxin response and distribution at high spatio-temporal resolution». *Nature* 482 (7383):103-6. <https://doi.org/10.1038/nature10791>.
- Bu, Q., Zhu, L., Dennis, M.D., Yu, L., Lu, S.X., Person, M.D., Tobin, E.M., Browning, K.S. y Huq, E. 2011. «Phosphorylation by CK2 enhances the rapid light-induced degradation of phytochrome interacting factor 1 in arabidopsis». *Journal of Biological Chemistry* 286 (14):12066-74.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.186882>.
- Caizergues-Ferrer, M., Belenguer, P., Lapeyre, B., Amalric, F., Wallace, M.O. y Olson, M.O.J. 1987. «Phosphorylation of nucleolin by a nucleolar type NII protein kinase.» *Biochemistry* 26 (24):7876-83.
- Caldana, C., Li, Y., Leisse, A., Zhang, Y., Bartholomaeus, L., Fernie, A.R., Willmitzer, L. y Giavalisco, P. 2013. «Systemic analysis of inducible target of rapamycin mutants reveal a general metabolic switch controlling growth in Arabidopsis thaliana». *Plant Journal* 73 (6):897-909. <https://doi.org/10.1111/tpj.12080>.
- Capron, A., Serralbo, O., Fulop, K., Frugier, F., Parmentier, Y., Dong, A., Lecureuil, A., Guerche, P., Kondorosi, E., Scheres, B. y Genschik, P. 2003. «The Arabidopsis Anaphase-Promoting Complex or Cyclosome: Molecular and Genetic Characterization of the APC2 Subunit». *the Plant Cell Online* 15 (10):2370-82.  
<https://doi.org/10.1105/tpc.013847>.
- De Carcer, G. y Medina, F.J. 1999. «Simultaneous localization of transcription and early processing markers allows dissection of functional domains in the plant cell nucleolus.» *Journal of structural biology* 128 (2):139-51.  
<https://doi.org/10.1006/jsbi.1999.4187>.
- Carpentier, M., Morelle, W., Coddeville, B., Pons, A., Masson, M., Mazurier, J. y Legrand, D. 2005. «Nucleolin undergoes partial N- and O-glycosylations in the extranuclear cell compartment». *Biochemistry* 44 (15):5804-15.  
<https://doi.org/10.1021/bi047831s>.
- Casal, J. J., Candia, A.N. y Sellaro, R. 2014. «Light perception and signalling by phytochrome A». *Journal of Experimental Botany* 65 (11):2835-45.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/ert379>.
- Cerdido, A., y Medina, F.J. 1995. «Subnucleolar location of fibrillarin and variation in its levels during the cell cycle and during differentiation of plant cells». *Chromosoma* 103 (9):625-34. <https://doi.org/10.1007/BF00357689>.
- Christianen, P.C.M. 2010. «Tuneable gravity using strong gradient magnetic fields». *ELGRA News Letter*, 2010.
- Christie, J.M., Salomon, M., Nozue, K., Wada, M. y Briggs, W.R. 1999. «LOV (light, oxygen, or voltage) domains of the blue-light photoreceptor phototropin (nph1): Binding

- sites for the chromophore flavin mononucleotide». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (15):8779-83. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.15.8779>.
- Christie, J.M., Blackwood, L., Petersen, J. y Sullivan, S. 2015. «Plant flavoprotein photoreceptors». *Plant and Cell Physiology* 56 (3):401-13. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu196>.
- Christie, J.M. y Murphy, A.S. 2013. «Shoot phototropism in higher plants: New light through old concepts». *American Journal of Botany* 100 (1):35-46. <https://doi.org/10.3732/ajb.1200340>.
- Christie, J.M., Yang, H., Richter, G.L., Sullivan, S., Thomson, C.E., Lin, J., Titapiwatanakun, B., Ennis, M., Kaiserli, E., Lee, O.R., Adames, J., Peer, W.A. y Murphy, A.S. 2011. «Phot1 inhibition of ABCB19 primes lateral Auxin Fluxes in the Shoot Apex required for Phototropism». *PLoS Biology* 9 (6). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001076>.
- Christie, J.M. 2007. «Phototropin Blue-Light Receptors». *Annual Review of Plant Biology* 58 (1):21-45. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.58.032806.103951>.
- Ciganda, M., y Williams, N. 2011. «Eukaryotic 5S rRNA biogenesis». *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 2 (4):523-33. <https://doi.org/10.1002/wrna.74>.
- Clack, T., Mathews, S. y Sharrock, R.A. 1994. «The phytochrome apoprotein family in Arabidopsis is encoded by five genes: the sequences and expression of PHYD and PHYE». *Plant Molecular Biology* 25 (3):413-27. <https://doi.org/10.1007/BF00043870>.
- Colón-Carmona, A., You, R., Haimovitch-gal, T. y Doerner, P. 1999. «Spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin - GUS fusion protein». *The Plant Journal* 20 (4):503-8.
- Comella, P., Pontvianne, F., Lahmy, S., Vignols, F., Barbezier, N., DeBures, A., Jobet, E., Brugidou, E., Echeverria, M. y Sáez-Vásquez, J. 2008. «Characterization of a ribonuclease III-like protein required for cleavage of the pre-rRNA in the 3'ETS in Arabidopsis». *Nucleic Acids Research* 36 (4):1163-75. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm1130>.
- Copenhaver, G.P. y Pikkard, C.S. 1996. «RFLP and physical mapping with an rDNA-specific endonuclease reveals that nucleolus organizer regions of Arabidopsis thaliana adjoin the telomeres on chromosomes 3 and 4». *The Plant Journal* 9 (2):259-72.
- Correll, M.J., Edelmann, R.E., Hangarter, R.P., Mullen, J.L. y Kiss, J.Z. 2005. «Ground-based studies of tropisms in hardware developed for the European Modular Cultivation System (EMCS)». *Advances in Space Research* 36 (7):1203-10. <https://doi.org/10.1016/j.asr.2004.11.003>.
- Correll, M.J., Pyle, T.P., Millar, K.D.L., Sun, Y., Yao, J., Edelmann, R.E. y Kiss, J.Z. 2013. «Transcriptome analyses of Arabidopsis thaliana seedlings grown in space: Implications for gravity-responsive genes». *Planta* (238):519-33. <https://doi.org/10.1007/s00425-013-1909-x>.
- Dal Bosco, C., Dovzhenko, A., Liu, X., Woerner, N., Rensch, T., Eismann, M., Eimer, S., Hegermann, J., Paponov, I.A., Ruperti, B., Heberle-Bors, E., Touraev, A., Cohen, J.D. y Palme, K. 2012. «The endoplasmic reticulum localized PIN8 is a pollen-specific auxin carrier involved in intracellular auxin homeostasis». *Plant Journal* 71 (5):860-70. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2012.05037.x>.
- Deng, C., Wang, T., Wu, J., Xu, W., Li, H., Liu, M., Wu, L., Lu, J. y Bian, P. 2017. «Effect of modeled microgravity on radiation-induced adaptive response of root growth in Arabidopsis thaliana». *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms*

- of *Mutagenesis* (796):20-28. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2017.02.002>.
- Deprost, D., Yao, L., Sormani, R., Moreau, M., Leterreux, G., Bedu, M., Robaglia, C. y Meyer, C. 2007. «The Arabidopsis TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation». *EMBO Reports* 8 (9):864-70. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7401043>.
- Dewitte, W., y Murray, J.A.H. 2003. «The Plant Cell Cycle». *Annual Review of Plant Biology* 54 (1):235-64. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.031902.134836>.
- Dharmasiri, S., Swarup, R., Mockaitis, K., Dharmasiri, N., Singh, S.K., Kowalchuk, M., Marchant, A., Mills, S., Sandberg, G., Bennette, M.S. y Estelle, M. 2006. «AXR4 is required for localization of the auxin influx facilitator AUX1». *Science* 312 (5777):1218-20. <https://doi.org/10.1126/science.1122847>.
- Ding, Z., Galván-Ampudia, C.S., Demarsy, E., Łangowski, L., Kleine-Vehn, J., Fan, Y., Morita, M.T., Tasak, A.M., Fankhauser, C., Offringa, R. y Friml, J. 2011. «Light-mediated polarization of the PIN3 auxin transporter for the phototropic response in Arabidopsis». *Nature Cell Biology* (13):447-452. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2208>.
- Ding, Z., Wang, B., Moreno, I., Ková, N.D., Simon, S., Carraro, N., Reemmer, J., Pencík, A., Chen, X., Tejos, R., Skupa, P., Pollmann, S., Mravec, J., Petrášek, J., Zazimalová, E., Honys, D., Rolčík, J., Murphy, A., Orellana, A., Geisler, M. y Friml, J. 2012. «ER-localized auxin transporter PIN8 regulates auxin homeostasis and male gametophyte development in Arabidopsis». *Nature Communications* 3 (May). <https://doi.org/10.1038/ncomms1941>.
- Driss-Ecole, D., Legué, V., Carnero-Díaz, E. y Perbal, G. 2008. «Gravisensitivity and automorphogenesis of lentil seedling roots grown on board the International Space Station». *Physiologia Plantarum* 134 (1):191-201. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2008.01121.x>.
- Durut, N., Abou-Ellail, M., Pontvianne, F., Das, S., Kojima, H., Ukai, S., de Bures, A., Comella, P., Nidelet, S., Rialle, S., Merret, R., Echeverria, M., Bouvet, P., Nakamura, K. y Sáez-Vásquez, J. 2014. «A Duplicated NUCLEOLIN Gene with Antagonistic Activity Is Required for Chromatin Organization of Silent 45S rDNA in Arabidopsis». *The Plant Cell* 26 (3):1330-44. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.123893>.
- Espunya, M.C., Combettes, B., Dot, J., Chaubet-Gigot, N. y Martinez, M.C. 1999. «Cell-cycle modulation of CK2 activity in tobacco BY-2 cells». *Plant Journal* 19 (6):655-66. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1999.00563.x>.
- Feldmann, K.A. 1991. «T-DNA insertion mutagenesis in Arabidopsis: mutational spectrum». *the Plant Journal* 1 (1):71-82.
- Ferl, R.J., Koh, J., Denison, F. y Paul, A.L. 2015. «Spaceflight Induces Specific Alterations in the Proteomes of Arabidopsis». *Astrobiology* 15 (1):32-56. <https://doi.org/10.1089/ast.2014.1210>.
- Ferl, R.J. y Paul, A.L. 2016. «The effect of spaceflight on the gravity-sensing auxin gradient of roots: GFP reporter gene microscopy on orbit». *NPJ Microgravity* 2 (1):15-23. <https://doi.org/10.1038/npjmgrav.2015.23>.
- Ferl, R.J., Wheeler, R., Levine, H.G. y Paul, A.L. 2002. «Plants in space». *Current Opinion in Plant Biology* 5 (3):258-63. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(02\)00254-6](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(02)00254-6).
- Ferreira, P., Hemerly, A., de Almeida Engler, J., Bergounioux, C., Burssens, S., Van Montagu, M., Engler, G. y Inzé, D. 1994. «Three discrete classes of Arabidopsis cyclins are expressed during different intervals of the cell cycle.» *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (24):11313-17. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.24.11313>.

- Firn, R.D., Wagstaff, C. y Digby, J. 2000. «The use of mutants to probe models of gravitropism». *Journal of Experimental Botany* 51 (349):1323-40. <https://doi.org/10.1093/jxb/51.349.1323>.
- Francis, D. 2007. «The plant cell cycle--15 years on.» *The New phytologist* 174 (2):261-78. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02038.x>.
- Friml, J., Benková, E., Blilou, I., Wisniewska, J., Hamann, T., Ljung, K., Woody, S., Ljung, K., Woody, S., Sandberg, G., Scheres, B., Jurgens, G. y Palme, P. 2002b. «AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in Arabidopsis». *Cell* 108 (5):661-73. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00656-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00656-6).
- Friml, J. y Palme, K. 2002. «Polar auxin transport--old questions and new concepts?» *Plant molecular biology* 49 (3-4):273-84. [https://doi.org/10.1007/978-94-010-0377-3\\_2](https://doi.org/10.1007/978-94-010-0377-3_2).
- Friml, J., Wiśniewska, J., Benková, E., Mendgen, K. y Palme, K. 2002a. «Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in Arabidopsis». *Nature* 415 (6873):806-9. <https://doi.org/10.1038/415806a>.
- Friml, J., Yang, X., Michniewicz, M., Weijers, D., Quint, A., Tietz, O., Benjamins, R., Ouwerkerk, P.B.F., Ljung, K., Sandberg, S., Hooykaas, P.J.J., Palme, K. y Offringa, R. 2004. «A PINOID-dependent binary switch in apical-basal PIN polar targeting directs auxin efflux». *Science* 306 (5697):862-65. <https://doi.org/10.1126/science.1100618>.
- Fujihira, K., Kurata, T., Watahiki, M.K., Karahara, I. y Yamamoto, K.T. 2000. «An agravitropic mutant of Arabidopsis, endodermal-amyloplast less 1, that lacks amyloplasts in hypocotyl endodermal cell layer». *Plant and Cell Physiology* 41 (11):1193-99. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcd046>.
- Galen, C., Rabenold, J.J. y Liscum, E. 2007. «Functional ecology of a blue light photoreceptor: Effects of phototropin-1 on root growth enhance drought tolerance in Arabidopsis thaliana». *New Phytologist* 173 (1):91-99. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01893.x>.
- Gälweiler, L., Guan, C., Müller, A., Wisman, E., Mendgen, K., Yephremov, A. y Palme, K. 1998. «Regulation of Polar Auxin Transport by AtPIN1 in Arabidopsis Vascular Tissue». *Science* 282 (5397):2226-30. <https://doi.org/10.1126/science.282.5397.2226>.
- Geisler, M. y Murphy, A.S. 2006. «The ABC of auxin transport: The role of p-glycoproteins in plant development». *FEBS Letters* 580 (4):1094-1102. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.11.054>.
- Geldner, N., Friml, J., Stierhof, Y.D., Jürgens, G. y Palme, K. 2001. «Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking». *Nature* 413 (septiembre). Macmillan Magazines Ltd.:425. <http://dx.doi.org/10.1038/35096571>.
- Genschik, P., Criqui, M., Parmentier, Y., Derevier, A. y Fleck, J. 1998. «Cell cycle - dependent proteolysis in plants. Identification Of the destruction box pathway and metaphase arrest produced by the proteasome inhibitor mg132». *The Plant cell* 10 (12):2063-76. <https://doi.org/10.1105/tpc.10.12.2063>.
- Ghisolfi, L., Kharrat, A., Joseph, G., Amalric, F. y Erard, M. 1992. «Concerted activities of the RNA recognition and the glycine-rich C-terminal domains of nucleolin are required for efficient complex formation with pre-ribosomal RNA». *European Journal of Biochemistry* 209 (2):541-48. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb17318.x>.
- Gilroy, S. 2008. «Plant tropisms». *Current Biology* 18:275-77.
- Ginisty, H., Sicard, H., Roger, B. y Bouvet, P. 1999. «Structure and functions of nucleolin.»



- Journal of cell science* 112:761-72. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.5.1476>.
- Goessens, G. 1976. «The nucleolar fibrillar centres in various cell types in vivo or in vitro». *Cell and Tissue Research* 173 (3):315-24. <https://doi.org/10.1007/BF00220319>.
- González-Camacho, F. y Medina, F.J. 2004. «Identification of specific plant nucleolar phosphoproteins in a functional proteomic analysis». *Proteomics* 4 (2):407-17. <https://doi.org/10.1002/pmic.200300645>.
- González-Camacho, F. y Medina, F.J. 2005. «The nucleolar structure and nucleolar proteins as indicators of cell proliferation events in plants». *Journal of Applied Biomedicine* (3):167-74.
- González-Camacho, F. y Medina, F.J. 2006. «The nucleolar structure and the activity of NopA100, a nucleolin-like protein, during the cell cycle in proliferating plant cells». *Histochemistry and Cell Biology* 125 (1-2):139-53. <https://doi.org/10.1007/s00418-005-0081-1>.
- Grunewald, W. y Friml, J. 2010. «The march of the PINs: Developmental plasticity by dynamic polar targeting in plant cells». *EMBO Journal* 29 (16):2700-2714. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.181>.
- Hang, R., Liu, C., Ahmad, A., Zhang, Y., Lu, F. y Cao, X. 2014. «*Arabidopsis* protein arginine methyltransferase 3 is required for ribosome biogenesis by affecting precursor ribosomal RNA processing». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (45):16190-95. <https://doi.org/10.1073/pnas.1412697111>.
- Hangarter, R.P. 1997. «Gravity, light and plant form». *Plant, Cell and Environment* 20 (6):796-800. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1997.d01-124.x>.
- Hardtke, C.S., Gohda, K., Osterlund, M.T., Oyama, T., Okada, K. y Deng, X.W. 2000. «HY5 stability and activity in *Arabidopsis* is regulated by phosphorylation in its COP1 binding domain». *The EMBO Journal* 19 (18):4997-5006. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.18.4997>.
- Hartig, K. y Beck, E. 2006. «Crosstalk between auxin, cytokinins, and sugars in the plant cell cycle». *Plant Biology* 8 (3):389-96. <https://doi.org/10.1055/s-2006-923797>.
- Heidstra, R. y Sabatini, S. 2014. «Plant and animal stem cells: similar yet different». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (15):301. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3790>.
- Herranz, R. y Medina, F.J. 2014. «Cell proliferation and plant development under novel altered gravity environments». *Plant Biology* (16):23-30. <https://doi.org/10.1111/plb.12103>.
- Herranz, R., Anken, R., Boonstra, J., Braun, M., Christianen, P.C.M., de Geest, M., Hauslage, J., Hilbig, R., Hill, R.J.A., Lebert, M., Medina, F.J., Vagt, N., Ullrich, O., van Loon, J.J.W.A. y Hemmersbach, R. 2013. «Ground-based facilities for simulation of microgravity: organism-specific recommendations for their use, and recommended terminology.» *Astrobiology* 13 (1):1-17. <https://doi.org/10.1089/ast.2012.0876>.
- Herranz, R., Larkin, O.J., Dijkstra, C.E., Hill, R.J.A., Anthony, P., Davey, R.R., Eaves, L., van Loon, J.J.W.A., Medina, F.J. y Marco, R. 2012. «Microgravity simulation by diamagnetic levitation: Effects of a strong gradient magnetic field on the transcriptional profile of *Drosophila melanogaster*». *BMC Genomics* 13 (1). BioMed Central Ltd:52. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-52>.
- Hohm, T., Preuten, T. y Fankhauser, C. 2013. «Phototropism: Translating light into directional growth». *American Journal of Botany* 100 (1):47-59. <https://doi.org/10.3732/ajb.1200299>.
- Hoson, T., Saito, Y., Soga, K. y Wakabayashi, K. 2005. «Signal perception, transduction,

- and response in gravity resistance. Another graviresponse in plants». *Advances in Space Research* 36 (7):1196-1202. <https://doi.org/10.1016/j.asr.2005.04.095>.
- Hoson, T. 1994. «Automorphogenesis of maize roots under simulated microgravity conditions». *Plant and Soil* 165 (2):309-14. <https://doi.org/10.1007/BF00008074>.
- Hoson, T. 2014. «Plant Growth and Morphogenesis under Different Gravity Conditions: Relevance to Plant Life in Space». *Life* 4 (2):205-16. <https://doi.org/10.3390/life4020205>.
- Hoson, T., Kamisaka, S., Masuda, Y., Yamashita, M. y Buchen, B. 1997. «Evaluation of the three-dimensional clinostat as a simulator of weightlessness». *Planta* 203 (S1):S187-97. <https://doi.org/10.1007/PL00008108>.
- Hoson, T., Matsumoto, S., Soga, K. y Wakabayashi, K. 2010. «Cortical microtubules are responsible for gravity resistance in plants». *Plant Signaling and Behavior* 5 (6):752-54. <https://doi.org/10.4161/psb.5.6.11706>.
- Hoson, T., Soga, K., Wakabayashi, K., Kamisaka, S. y Tanimoto, E. 2003. «Growth and cell wall changes in rice roots during spaceflight BT - Roots: The Dynamic Interface between Plants and the Earth: The 6th Symposium of the International Society of Root Research, 11–15 November 2001, Nagoya, Japan. Editado por Jun Abe, 19-26. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-2923-9\\_3](https://doi.org/10.1007/978-94-017-2923-9_3).
- Huang, Y., Baxter, R., Smith, B.S., Partch, C.L., Colbert, C.L. y Deisenhofer, J. 2006. «Crystal structure of cryptochrome 3 from *Arabidopsis thaliana* and its implications for photolyase activity». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (47):17701-6. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608554103>.
- Huijser, R.H. 2000. «Desktop RPM: new small size microgravity simulator for the bioscience laboratory». *Fokker Space*, n.º August:1-5.
- Iino, M. 2006. «Toward understanding the ecological functions of tropisms : interactions among and effects of light on tropisms Commentary». *Current Opinion in Plant Biology* (9):89-93. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2005.11.012>.
- Inada, S., Ohgishi, M., Mayama, T., Okada, K. y Sakai, T. 2004. «RPT2 is a signal transducer involved in phototropic response and stomatal opening by association with phototropin 1 in *Arabidopsis thaliana*». *The Plant cell* 16 (4):887-96. <https://doi.org/10.1105/tpc.019901>.
- Inzé, D. y De Veylder, L. 2006. «Cell cycle regulation in plant development.» *Annual review of genetics* (40):77-105. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.40.110405.090431>.
- Ito, M., Iwase, M., Kodama, H., Lavis, P., Komamine, A., Nishihama, R., Machida, Y. y Watanabe, A. 1998. «A novel cis-acting element in promoters of plant B-type cyclin genes activates M phase-specific transcription.» *The Plant cell* 10 (3):331-41. <https://doi.org/10.1105/TPC.10.3.331>.
- Ito, M., Araki, S. y Matsunaga, S. 2001. «G2 / M-Phase – Specific transcription during the plant cell cycle Is mediated by c-Myb – like transcription factors». *Plant Cell* (13):1891-1905. <http://www.plantcell.org/content/13/8/1891.short>.
- Jarillo, J.A., Gabrys, H., Capel, J., Alonso, J.M., Ecker, J.R. y Cashmore, A.R. 2001. «Phototropin-related NPL1 controls chloroplast relocation induced by blue light». *Nature* 410 (6831):952-54. <https://doi.org/10.1038/35073622>.
- Kaiserli, E., Sullivan, S., Jones, M.A., Feeney, K.A. y Christie, J.M. 2009. «Domain Swapping to Assess the Mechanistic Basis of *Arabidopsis* Phototropin 1 Receptor Kinase Activation and Endocytosis by Blue Light». *The Plant Cell* 21 (10):3226-44. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.067876>.
- Kamal, K.Y., Herranz, R., van Loon, J.J.WA. y Medina, F.J. 2018a. «Simulated microgravity,

- Mars gravity, and 2g hypergravity affect cell cycle regulation, ribosome biogenesis, and epigenetics in Arabidopsis cell cultures». *Scientific Reports* 8 (1):1-16. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24942-7>.
- Kamal, K.Y., Herranz, R., van Loon, J.J.W.A. y Medina, F.J. 2018b. «Cell cycle acceleration and changes in essential nuclear functions induced by simulated microgravity in a synchronized Arabidopsis cell culture». *Plant, Cell & Environment*, 1-15. <https://doi.org/10.1111/pce.13422>.
- Kiefer, J. y Pross, H.D. 1999. «Space radiation effects and microgravity». *Mutat Res* 430 (2):299-305. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0027-5107\(99\)00142-6](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0027-5107(99)00142-6).
- Kim, D., Langmead, B. y Salzberg, S.L. 2015. «HISAT: A fast spliced aligner with low memory requirements». *Nature Methods* 12 (4):357-60. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3317>.
- Kircher, S., Kozma-Bognar, L., Kim, L., Adam, E., Harter, K., Schäfer, E. y Nagy, F. 1999. «Light Quality Dependent Nuclear Import of the Plant Photoreceptors Phytochrome A and B». *the Plant Cell Online* 11 (8):1445-56. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.8.1445>.
- Kircher, S. y Schopfer, P. 2012. «Photosynthetic sucrose acts as cotyledon-derived long-distance signal to control root growth during early seedling development in Arabidopsis». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (28):11217-21. <https://doi.org/10.1073/pnas.1203746109>.
- Kiss, J.Z. 2000. «Mechanisms of the early phases of plant gravitropism». *Critical Reviews in Plant Sciences* 19 (6):551-73. <https://doi.org/10.1080/07352680091139295>.
- Kiss, J.Z. 2007a. «Where's the water? Hydrotropism in plants». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (11):4247-48. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700846104>.
- Kiss, J.Z., Correll, M.J., Mullen, J.L., Hangarter, R.P. y Edelmann, R.E. 2003. «Root phototropism: how light and gravity interact in shaping plant form». *Gravit Space Biol Bull* 16 (2):55-60. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12959132>.
- Kiss, J.Z., Mullen, J.L., Correll, M.J. y Hangarter, R.P. 2003. «Phytochromes A and B mediate red-light-induced positive phototropism in roots.» *Plant physiology* 131 (3):1411-17. <https://doi.org/10.1104/pp.013847>.
- Kiss, J.Z., Aanes, G., Schiefloe, M., Coelho, L.H.F., Millar, K.D.L. y Edelmann, R.E. 2014. «Changes in operational procedures to improve spaceflight experiments in plant biology in the European Modular Cultivation System». *Advances in Space Research* 53 (5). COSPAR:818-27. <https://doi.org/10.1016/j.asr.2013.12.024>.
- Kiss, J.Z., Guisinger, M.M., Miller, A.J. y Stackhouse, K.S. 1997. «Reduced Gravitropism in Hypocotyls of Starch-Deficient Mutants of Arabidopsis». *Plant and Cell Physiology* 38 (5):518-25. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a029199>.
- Kiss, J.Z., Kumar, P., Bowman, R.N., Steele, M.K., Eodice, M.T., Correll, M.J. y Edelmann, R.E. 2007b. «Biocompatibility studies in preparation for a spaceflight experiment on plant tropisms (TROPI)». *Advances in Space Research* 39 (7):1154-60. <https://doi.org/10.1016/j.asr.2006.12.017>.
- Kiss, J.Z., Kumar, P., Millar, K.D.L., Edelmann, R.E. y Correll, M.J. 2009. «Operations of a spaceflight experiment to investigate plant tropisms». *Advances in Space Research* 44 (8). COSPAR:879-86. <https://doi.org/10.1016/j.asr.2009.06.007>.
- Kiss, J.Z., Millar, K.D.L. y Edelmann, R.E. 2012. «Phototropism of Arabidopsis thaliana in microgravity and fractional gravity on the International Space Station». *Planta* 236 (2):635-45. <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1633-y>.
- Kiss, J.Z. 2015. «Conducting Plant Experiments in Space BT - Plant Gravitropism:

- Methods and Protocols». En , editado por Elison B Blancaflor, 255-83.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2697-8\\_19](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2697-8_19).
- Kiss, J.Z., Hertel, R. y Sack, F.D. 1989. «Amyloplasts are necessary for full gravitropic sensitivity in roots of *Arabidopsis thaliana*». *Planta* 177 (2). Springer:198-206.  
<http://www.jstor.org/stable/23379785>.
- Kiss, J.Z., Millar, K.D.L., Kumar, P., Edelmann, R.E. y Correll, M.J. 2011. «Improvements in the re-flight of spaceflight experiments on plant tropisms». *Advances in Space Research* 47 (3). COSPAR:545-52. <https://doi.org/10.1016/j.asr.2010.09.024>.
- Kiss, J.Z., y Sack, F.D. 1989. «Reduced gravitropic sensitivity in roots of a starch-deficient mutant of *Nicotiana sylvestris*». *Planta* 180 (1):123-30.  
<https://doi.org/10.1007/BF02411418>.
- Kong, S.G., Suzuki, T., Tamura, K., Mochizuki, N., Hara-Nishimura, I. y Nagatani, A. 2006. «Blue light-induced association of phototropin 2 with the Golgi apparatus». *Plant Journal* 45 (6):994-1005. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02667.x>.
- Kranz, A. R., Gartenbach, K.E. y Zimmermann, M.W. 1994. «Initial approach to comparative studies on the evolutionary potentials of space radiation effects in a plant system». *Advances in Space Research* 14 (10):383-88.  
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0273-1177\(94\)90491-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0273-1177(94)90491-X).
- Kranz, A.R. 1987. «Genetic resources in *Arabidopsis*». *Arabia. Inf. Serv.* 24.  
<http://ci.nii.ac.jp/naid/10030963718/en/>.
- Krecek, P., Skupa, P., Libus, J., Naramoto, S., Tejos, R., Friml, J. y Zazimalova, E. 2009. «The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters». *Genome Biology* 10 (12):1-11. <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-12-249>.
- Kuang, A., Popova, A., McClure, G. y Musgrave, M.E. 2005. «Dynamics of Storage Reserve Deposition during *Brassica rapa* L. Pollen and Seed Development in Microgravity». *International Journal of Plant Sciences* 166 (1):85-96.  
<https://doi.org/10.1086/425664>.
- Kuang, A., Xiao, Y. y Musgrave, M.E. 1996. «Cytochemical Localization of Reserves during Seed Development in *Arabidopsis thaliana* under Spaceflight Conditions». *Annals of Botany* 78 (3):343-51. <https://doi.org/10.1006/anbo.1996.0129>.
- Kumar, P., Millar, K.D.L. y Kiss, J.Z. 2011. «Inflorescence stems of the *mdr1* mutant display altered gravitropism and phototropism». *Environmental and Experimental Botany* 70 (2-3):244-50. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.09.019>.
- Kwon, T., Sparks, J.A., Nakashima, J., Allen, S.N., Tang, Y. y Blancaflor, E.B. 2015. «Transcriptional response of *Arabidopsis* seedlings during spaceflight reveals peroxidase and cell wall remodeling genes associated with root hair development». *American Journal of Botany* 102 (1):21-35. <https://doi.org/10.3732/ajb.1400458>.
- Lange, H., Sement, F.M. y Gagliardi, D. 2011. «MTR4, a putative RNA helicase and exosome co-factor, is required for proper rRNA biogenesis and development in *Arabidopsis thaliana*». *Plant Journal* 68 (1):51-63. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04675.x>.
- Langmead, B. y Salzberg, S.L. 2012. «Fast gapped-read alignment with Bowtie 2». *Nature Methods* 9 (4):357-59. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>.
- Lapeyre, B., Amalric, F., Ghaffari, S.H., Rao, S.V., Dumbbar, T.S. y Olson, M.O. 1986. «Protein and cDNA sequence of a glycine-rich, dimethylarginine-containing region located near the carboxyl-terminal end of nucleolin (C23 and 100 kDa)». *Journal of Biological Chemistry* 261 (20):9167-73.
- Di Laurenzio, L., Wysocka-Diller, J., Malamy, J.E., Pysh, L., Helariutta, Y., Freshour, G., Hahn, M.G., Feldmann, K.A. y Benfey, P.N. 1996. «The SCARECROW gene regulates

- an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the Arabidopsis root». *Cell* 86 (3):423-33. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80115-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80115-4).
- Leitz, G., Kang, B.H., Schoenwaelder, M.E.A. y Staehelin, L.A. 2009. «Statolith sedimentation kinetics and force transduction to the cortical endoplasmic reticulum in gravity-sensing Arabidopsis columella cells.» *The Plant cell* 21 (3):843-60. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.065052>.
- Leivar, P. y Quail, P.H. 2011. «PIFs: Pivotal components in a cellular signaling hub». *Trends in Plant Science* 16 (1):19-28. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.08.003>.
- Lewinska, A., Wnuk, M., Grzelak, A. y Bartosz, G. 2010. «Nucleolus as an oxidative stress sensor in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*». *Redox Report* 15 (2):87-96. <https://doi.org/10.1179/174329210X12650506623366>.
- Li, Q.H. y Yang, H.Q. 2007. «Cryptochrome Signaling in Plants†». *Photochemistry and Photobiology* 83 (1):94-101. <https://doi.org/10.1562/2006-02-28-IR-826>.
- Link, B.M., Busse, J.S. y Stankovic, B. 2014. «Seed-to-seed-to-seed growth and development of arabidopsis in microgravity.» *Astrobiology* 14 (10):866-75. <https://doi.org/10.1089/ast.2014.1184>.
- Liu, X., Cohen, J.D. y Gardner, G. 2011. «Low-Fluence Red Light Increases the Transport and Biosynthesis of Auxin». *Plant Physiology* 157 (2):891-904. <https://doi.org/10.1104/pp.111.181388>.
- Livak, K.J. y Schmittgen, T.D. 2001. «Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method». *Methods* 25 (4):402-8. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- Ljung, K., Hull, A.K., Celenza, J., Yamada, M., Estelle, M., Normanly, J. y Sandberg, G. 2005. «Sites and regulation of auxin biosynthesis in Arabidopsis roots». *The Plant Cell* (17):1090-1104. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.029272.farther>.
- van Loon, J.J.W.A. 2007. «Some history and use of the random positioning machine, RPM, in gravity related research». *Advances in Space Research* 39 (7):1161-65. <https://doi.org/10.1016/j.asr.2007.02.016>.
- Lopez-Juez, E., Dillon, E., Magyar, Z., Khan, S., Hazeldine, S., de Jager, S.M., Murray, J.A.H., Beemster, G.T.S., Bögge, L. y Shanahan, H. 2008. «Distinct Light-Initiated Gene Expression and Cell Cycle Programs in the Shoot Apex and Cotyledons of Arabidopsis». *the Plant Cell Online* 20 (4):947-68. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.057075>.
- Lui, H., Wang, H., DeLong, C., Fowke, L.C., Crosby, W.L. y Fobert, P.R. 2000. «The Arabidopsis Cdc2a-interacting protein ICK2 is structurally related to ICK1 and is a potent inhibitor of cyclin-dependent kinase activity in vitro». *Plant Journal* 21 (4):379-85. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2000.00688.x>.
- Maalouf, M., Durante, M. y Foray, N. 2011. «Biological Effects of Space Radiation on Human Cells: History, Advances and Outcomes». *Journal of Radiation Research* 52 (2):126-46. <https://doi.org/10.1269/jrr.10128>.
- MacCleery, S.A. y Kiss, J.Z. 1999. «Plastid Sedimentation Kinetics in Roots of Wild-Type and Starch-Deficient Mutants of Arabidopsis». *Plant Physiology* 120 (1):183-92. <https://doi.org/10.1104/pp.120.1.183>.
- Magyar, Z., Mészáros, T., Miskolczi, P., Deák, M., Fehér, A., Brown, S., Kondorosi, E., Athanasiadis, A., Pongor, S., Bilgin, M., Bakó, L., Konczla, C. y Duditsa, D. 1997. «Cell cycle phase specificity of putative cyclin-dependent kinase variants in synchronized alfalfa cells.» *The Plant cell* 9 (2):223-35.

- <https://doi.org/10.1105/tpc.9.2.223>.
- Magyar, Z., De Veylder, L., Atanassova, A., Bakó, L., Inzé, D. y Bogre, L. 2005. «The Role of the Arabidopsis E2FB Transcription Factor in». *Plant Cell* (17):2527-41.  
<https://doi.org/10.1105/tpc.105.033761.1>.
- Maher, E. P. y Martindale, S.J.B. 1980. «Mutants of Arabidopsis thaliana with altered responses to auxins and gravity». *Biochemical Genetics* 18 (11):1041-53.  
<https://doi.org/10.1007/BF00484337>.
- Manzano, A.I., Herranz, R., van Loon, J.J.W.A. y Medina, F.J. 2012b. «A Hypergravity Environment Induced by Centrifugation Alters Plant Cell Proliferation and Growth in an Opposite Way to Microgravity». *Microgravity Science and Technology* (24):373-81. <https://doi.org/10.1007/s12217-012-9301-1>.
- Manzano, A.I., Herranz, R., Manzano, A., van Loon, J.J.W.A. y Medina, F.J. 2016. «Early Effects of Altered Gravity Environments on Plant Cell Growth and Cell Proliferation: Characterization of Morphofunctional Nucleolar Types in an Arabidopsis Cell Culture System». *Frontiers in Astronomy and Space Sciences* (3):1-13.  
<https://doi.org/10.3389/fspas.2016.00002>.
- Manzano, A.I., Matía, I., González-Camacho, F., Carnero-Díaz, E., Van Loon, J.J.W.A., Dijkstra, C., Larkin, O., Anthony, P., Davey, M.R., Marco, R. y Medina, F.J. 2009. «Germination of arabidopsis seed in space and in simulated microgravity: Alterations in root cell growth and proliferation». *Microgravity Science and Technology* 21 (4):293-97. <https://doi.org/10.1007/s12217-008-9099-z>.
- Manzano, A.I., van Loon, J.J.W.A., Christianen, P.C.M., Gonzalez-Rubio, J.M., Medina, F.J. y Herranz, R. 2012a. «Gravitational and magnetic field variations synergize to cause subtle variations in the global transcriptional state of Arabidopsis in vitro callus cultures». *BMC Genomics* 13 (1). BioMed Central Ltd:105.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-105>.
- Manzano, A.I., Larkin, O.J., Dijkstra, C.E., Anthony, P., Davey, M.R., Eaves, L., Hill, R.J.A., Herranz, R. y Medina, F.J. 2013. «Meristematic cell proliferation and ribosome biogenesis are decoupled in diamagnetically levitated Arabidopsis seedlings». *BMC Plant Biology* 13 (1). <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-124>.
- Marchant, A., Kargul, J., May, S.T., Muller, P., Delbarre, A., Perrot-Rechenmann, C. y Bennett, M.J. 1999. «AUX1 regulates root gravitropism in Arabidopsis by facilitating auxin uptake within root apical tissues.» *The EMBO journal* 18 (8):2066-73.  
<https://doi.org/10.1093/emboj/18.8.2066>.
- Marquès-Bueno, M.M., Moreno-Romero, J., Abas, L., de Michele, R. y Martínez, M.C. 2011a. «Linking protein kinase CK2 and auxin transport». *Plant Signaling & Behavior* 6 (10):1603-5. <https://doi.org/10.4161/psb.6.10.17136>.
- Marquès-Bueno, M.M., Moreno-Romero, J., Abas, L., de Michele, R. y M. Martínez, M.C. 2011b. «A dominant negative mutant of protein kinase CK2 exhibits altered auxin responses in Arabidopsis». *Plant Journal* 67 (1):169-80.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04585.x>.
- Martel, V., Filhol, O., Nueda, A., Gerber, D., Benitez, M.J. y Cochet, C. 2001. «Visualization and molecular analysis of nuclear import of protein kinase CK2 subunits in living cells.» *Mol. Cell Biochemistry*. (227):81-90.
- Massa, G., Newsham, G., Hummerick, M.E., Caro, J.L., Stutte, G.W., Morrow, R.C. y Wheeler, R.M. 2013. «Preliminary Species and Media Selection for the Veggie Space Hardware.» *Gravitational and Space Research* 1 (1):95-106.  
<http://gravitationalandspacebiology.org/index.php/journal/article/view/616>.
- Matía, I., González-Camacho, F., Herranz, R., Kiss, J.Z., Gasset, G., van Loon, J.J.W.A.,

- Marco, R. y Medina, F.J. 2010. «Plant cell proliferation and growth are altered by microgravity conditions in spaceflight». *Journal of Plant Physiology* 167 (3):184-93. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.08.012>.
- Matía, I., González-Camacho, F., Marco, R., Kiss, J.Z., Gasset, G., Van Loon, J.J.W.A. y Medina, F.J. 2007. «The “root” experiment of the “cervantes” Spanish Soyuz mission: Cell proliferation and nucleolar activity alterations in arabidopsis roots germinated in real or simulated microgravity». *Microgravity Science and Technology* 19 (5-6):128-32. <https://doi.org/10.1007/BF02919467>.
- Matía, I., González-Camacho, F., Marco, R., Kiss, J.Z., Gasset, G. y Medina, F.J. 2005. «Nucleolar structure and proliferation activity of Arabidopsis root cells from seedlings germinated on the International Space Station». *Advances in Space Research* 36 (7):1244-53. <https://doi.org/10.1016/j.asr.2005.01.068>.
- Matía, I., van Loon, J.J.W.A., Carnero-Díaz, E., Marco, R. y Medina, F.J. 2009. «Seed Germination and Seedling Growth under Simulated Microgravity Causes Alterations in Plant Cell Proliferation and Ribosome Biogenesis». *Microgravity Science and Technology* 21 (1-2):169-74. <https://doi.org/10.1007/s12217-008-9069-5>.
- Mayer, C. y Grummt, I. 2005. «Cellular stress and nucleolar function». *Cell Cycle* 4 (8):1036-38. <https://doi.org/10.4161/cc.4.8.1925>.
- Medina, F. J., Cerdido, A. y De Cárcer, G. 2000. «The functional organization of the nucleolus in proliferating plant cells». *European Journal of Histochemistry* 44 (2):117-31.
- Medina, F.J., Cerdido, A. y Fernández-Gómez, M.E. 1995. «Components of the Nucleolar Processing Complex (Pre-rRNA, Fibrillarin, and Nucleolin) Colocalize during Mitosis and Are Incorporated to Daughter Cell Nucleoli». *Experimental cell research* (221):111-25.
- Medina, F.J., González-Camacho, F., Manzano, A.I., Manrique, A. y Herranz, R. 2010. «Nucleolin, a major conserved multifunctional nucleolar phosphoprotein of proliferating cells». *Journal of Applied Biomedicine* 8 (3):141-50. <https://doi.org/10.2478/v10136-009-0017-5>.
- Meinke, D. y Koornneef, M. 1997. «Community standards for Arabidopsis genetics». *The Plant Journal* 12 (2):247-53. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113.1997.12020247.x>.
- De Micco, V., De Pascale, S., Paradiso, R. y Aronne, G. 2014. «Microgravity effects on different stages of higher plant life cycle and completion of the seed-to-seed cycle». *Plant Biology* (16):31-38. <https://doi.org/10.1111/plb.12098>.
- De Micco, V., Arena, C., Pignalosa, D. y Durante, M. 2011. «Effects of sparsely and densely ionizing radiation on plants». *Radiation and Environmental Biophysics* 50 (1):1-19. <https://doi.org/10.1007/s00411-010-0343-8>.
- Millar, K.D.L, Kumar, P., Correll, M.J., Mullen, J.L., Hangarter, R.P., Edelman, R.E. y Kiss, J.Z. 2010. «A novel phototropic response to red light is revealed in microgravity». *New Phytologist* 186 (3):648-56. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03211.x>.
- Mironov, V., De Veylder, L., Van Montagu, M. y Inze, D. 1999. «Cyclin-Dependent Kinases and Cell Division in Plants— The Nexus». *Plant Cell* 11 (4):509-22. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.4.509>.
- Mizukami, Y. 2001. «A matter of size: Developmental control of organ size in plants». *Current Opinion in Plant Biology* 4 (6):533-39. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(00\)00212-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(00)00212-0).

- Mo, M., Yokawa, K., Wan, Y. y Baluška, F. 2015. «How and why do root apices sense light under the soil surface?» *Frontiers in Plant Science* (6):1-8.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00775>.
- Mohammed, B., Biloei, S.F., Doczi, R., Grove, E., Railo, S., Palme, K., Ditengou, F.A., Bögre, L. y Lopez-Juez, E. 2017. «Converging energy and hormonal signalling control meristem activity, leaf initiation and growth». *Plant Physiology* (176):1363-1381  
<https://doi.org/10.1104/pp.17.01730>.
- Molas, M.L. y Kiss, J.Z. 2009. «Chapter 1 Phototropism and Gravitropism in Plants». *Advances in Botanical Research* 49 (08):1-34. [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(08\)00601-0](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(08)00601-0).
- Moreno-Romero, J., Espunya, M.C., Platara, M., Ariño, J. y Martínez, M.C. 2008. «A role for protein kinase CK2 in plant development: evidence obtained using a dominant-negative mutant». *The Plant Journal* 55 (1):118-30.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03494.x>.
- Morimoto, H., Okamura, H. y Haneji, T. 2012. «Interaction of Protein Phosphatase 1 deltawith Nucleophosmin in Human Osteoblastic Cells». *Acta Histochemica Et Cytochemica* 45 (1):1-7. <https://doi.org/10.1267/ahc.11041>.
- Morita, M.T. 2010. «Directional Gravity Sensing in Gravitropism». *Annual Review of Plant Biology* 61 (1):705-20. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.043008.092042>.
- Motchoulski, A., y Liscum, E. 1999. «Arabidopsis NPH3: A NPH1 photoreceptor-interacting protein essential for phototropism». *Science* 286 (5441):961-64.  
<https://doi.org/10.1126/science.286.5441.961>.
- Mravec, J., Skůpa, P., Bailly, A., Hoyerová, K., Křeček, P., Bielach, A., Petrášek, J., Zhang, J., Gaykova, V., Stierhof, Y.D., Dobrev, P.T., Schwarzerova, K., Rolcik, J., Seifertová, D., Luschnig, C., Benkivá, E., Zazimalova, E., Geisler, M. y Firml, J. 2009. «Subcellular homeostasis of phytohormone auxin is mediated by the ER-localized PIN5 transporter». *Nature* (459):1136-1140. <http://dx.doi.org/10.1038/nature08066>.
- Müller, A., Guan, C., Gälweiler, L., Tänzler, P., Huijser, P., Marchant, A., Parry, G., Bennett, M., Wisman, E. y Palme, K. 1998. «AtPIN2 defines a locus of Arabidopsis for root gravitropism control». *EMBO Journal* 17 (23):6903-11.  
<https://doi.org/10.1093/emboj/17.23.6903>.
- Murray, J. 2002. «Darwin, C. R. 1880.»
- Musielak, T.J., Schenkel, L., Kolb, M., Henschen, A. y Bayer, M. 2015. «A simple and versatile cell wall staining protocol to study plant reproduction». *Plant Reproduction* 28 (3):161-69. <https://doi.org/10.1007/s00497-015-0267-1>.
- Nagata, T., Todoriki, S., Hayashi, T., Shibata, Y., Mori, M., Kanegae, H. y Kikuchi, S. 1999. «Gamma-radiation induces leaf trichome formation in Arabidopsis.» *Plant physiology* 120 (1):113-20. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.120.1.113>.
- Nakagami, H., Kawamura, K., Sugisaka, K., Sekine, M. y Shinmyo, A. 2002. «Phosphorylation of retinoblastoma-related protein by the cyclin D/cyclin-dependent kinase complex is activated at the G1/S-phase transition in tobacco.» *The Plant cell* 14 (8):1847-57. <https://doi.org/10.1105/tpc.002550>.
- Nakashima, J., Liao, F., Sparks, J.A., Tang, Y. y Blancaflor, E.B. 2014. «The actin cytoskeleton is a suppressor of the endogenous skewing behaviour of Arabidopsis primary roots in microgravity». *Plant Biology* (16):142-50.  
<https://doi.org/10.1111/plb.12062>.
- Nemhauser, J.L. 2008. «Dawning of a New Era: Photomorphogenesis as an Integrated Molecular Network». *Current Opinion in Plant Biology* 11 (1).  
<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.10.005>.



- Niewmierzycka, A. y Clarke, S. 1999. «S-Adenosylmethionine-dependent Methylation in *Saccharomyces cerevisiae*». *Journal of Biological Chemistry* 274 (2):814-24. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.2.814>.
- Nishihama, R. y Kohchi, T. 2013. «Evolutionary insights into photoregulation of the cell cycle in the green lineage». *Current Opinion in Plant Biology* 16 (5). Elsevier Ltd:630-37. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2013.07.006>.
- Noh, B., Bandyopadhyay, A., Peer, W.A., Spalding, E.P. y Murphy, A.S. 2003. «Enhanced gravi- and phototropism in plant *mdr* mutants mislocalizing the auxin efflux protein PIN1». *Nature* (423):999-1002. <http://dx.doi.org/10.1038/nature01716>.
- Norbert, L. y Jozefa, W.G. 2018. «ADP-ribosylation of nucleolar proteins in HeLa tumor cells». *Journal of Cellular Biochemistry* 52 (2):153-58. <https://doi.org/10.1002/jcb.240520207>.
- Ottenschlager, I., Wolff, P., Wolverton, C., Bhalerao, R.P., Sandberg, G., Ishikawa, H., Evans, M. y Palme, K. 2003. «Gravity-regulated differential auxin transport from columella to lateral root cap cells». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (5):2987-91. <https://doi.org/10.1073/pnas.0437936100>.
- Park, H.J., Ding, L., Dai, M., Lin, R. y Wang, H. 2008. «Multisite phosphorylation of Arabidopsis HFR1 by casein kinase II and a plausible role in regulating its degradation rate». *Journal of Biological Chemistry* 283 (34):23264-73. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801720200>.
- Paul, A.L., Zupanska, A.K., Schultz, E.R. y Ferl, R.J. 2013b. «Organ-specific remodeling of the Arabidopsis transcriptome in response to spaceflight». *BMC Plant Biology* 13 (1):112. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-112>.
- Paul, A.L., Zupanska, A.K., Ostrow, D.T., Zhang, Y., Sun, Y., Li, J.L., Shanker, S., Farmerie, W.G., Amalfitano, C.E. y Ferl, R.J. 2012. «Spaceflight Transcriptomes: Unique Responses to a Novel Environment». *Astrobiology* 12 (1):40-56. <https://doi.org/10.1089/ast.2011.0696>.
- Paul, A.L., Popp, M.P., Gurley, W.B., Guy, C., Norwood, K.L. y Ferl, R.J. 2005. «Arabidopsis gene expression patterns are altered during spaceflight». *Advances in Space Research* 36 (7):1175-81. <https://doi.org/10.1016/j.asr.2005.03.066>.
- Paul, A.L., Sng, N.J., Zupanska, A.K., Krishnamurthy, A., Schultz, E.R. y Ferl, R.J. 2017. «Genetic dissection of the Arabidopsis spaceflight transcriptome: Are some responses dispensable for the physiological adaptation of plants to spaceflight?» *PLoS ONE* 12 (6):1-24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180186>.
- Paul, A.L., Wheeler, R.M., Levine, H.G. y Ferl, R.J. 2013a. «Fundamental plant biology enabled by the space shuttle». *American Journal of Botany* 100 (1):226-34. <https://doi.org/10.3732/ajb.1200338>.
- Pedmale, U.V. y Liscum, E. 2007. «Regulation of phototropic signaling in Arabidopsis via phosphorylation state changes in the phototropin 1-interacting protein NPH3». *Journal of Biological Chemistry* 282 (27):19992-1. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702551200>.
- Perbal, G., y Driss-Ecole, D. 1994. «Sensitivity to gravistimulus of lentil seedling roots grown in space during the IML 1 Mission of Spacelab». *Physiologia Plantarum* 90 (2). Wiley/Blackwell (10.1111):313-18. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1994.tb00393.x>.
- Perbal, G. y Driss-Ecole, D. 2003. «Mechanotransduction in gravisensing cells». *Trends in Plant Science* 8 (10):498-504. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2003.09.005>.
- Perbal, G., Jeune, B., Lefranc, A., Carnero-Diaz, E. y Driss-Ecole, D. 2002. «The dose-response curve of the gravitropic reaction: A re-analysis». *Physiologia Plantarum*

- 114 (3):336-42. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2002.1140302.x>.
- Petrasek, J. y Friml, J. 2009. «Auxin transport routes in plant development». *Development* 136 (16):2675-88. <https://doi.org/10.1242/dev.030353>.
- Petricka, J.J. y Nelson, T.M. 2007. «Arabidopsis Nucleolin Affects Plant Development and Patterning». *Plant Physiology* 144 (1):173-86. <https://doi.org/10.1104/pp.106.093575>.
- Pickard, B.G. y Thimann, K.V. 1963. «Transport and Distribution of Auxin during Tropistic Response», (19):341-50.
- Pickett, F.B, Wilson, A.K. y Estelle, M. 1990. «The aux1 Mutation of Arabidopsis Confers Both Auxin and Ethylene Resistance.» *Plant physiology* 94 (3):1462-66. <https://doi.org/10.1104/pp.94.3.1462>.
- Pih, K.T, Yi, M.J., Liang, Y.S., Shin, B.J., Cho, M.J., Hwang, I. y Son, D. 2000. «Molecular cloning and targeting of a fibrillarin homolog from Arabidopsis.» *Plant physiology* 123 (1):51-58. <https://doi.org/10.1104/pp.123.1.51>.
- Pontvianne, F., Matía, I., Douet, J., Tourmente, S., Medina, F.J., Echevarria, M. y Sáez-Vásquez, J. 2007. «Characterization of AtNUC-L1 Reveals a Central Role of Nucleolin in Nucleolus Organization and Silencing of AtNUC-L2 Gene in Arabidopsis». *Molecular Biology of the Cell* 18 (8):369-79. <https://doi.org/10.1091/mbc.E06>.
- Pontvianne, F., Abou-Ellail, M., Douet, J., Comella, P., Matia, I., Chandrasekhara, C., DeBures, A., Blevins, T., Cooke, R., Medina, F.J., Tourmente, S., Pikaard, C.S. y Julio Saéz-Vásquez, J. 2010. «Nucleolin is required for DNA methylation state and the expression of rRNA gene variants in Arabidopsis thaliana». *PLoS Genetics* 6 (11):1-13. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001225>.
- Porterfield, D.M. 2002. «The Biophysical Limitations in Physiological Transport and Exchange in Plants Grown in Microgravity». *Journal of Plant Growth Regulation* 21 (2):177-90. <https://doi.org/10.1007/s003440010054>.
- Potuschak, T. y Doerner, P. 2001. «Cell cycle controls: genome-wide analysis in Arabidopsis.» *Current opinion in plant biology* 4 (6):501-6. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(00\)00207-7](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(00)00207-7)
- Del Pozo, J.C., Boniotti, M.B. y Gutierrez, C. 2002. «Arabidopsis E2Fc Functions in Cell Division and Is Degraded by the Ubiquitin-SCF AtSKP2 Pathway in Response to Light». *Society* (14):3057-71. <https://doi.org/10.1105/tpc.006791.et>.
- Del Pozo, J.C., Lopez-Matas, M.A., Ramirez-Parra, E. y Gutierrez, C. 2005. «Hormonal control of the plant cell cycle». *Physiologia Plantarum* 123 (2):173-83. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2004.00420.x>.
- Raška, I., Shaw, P.J. y Cmarko, D. 2006. «Structure and function of the nucleolus in the spotlight». *Current Opinion in Cell Biology* 18 (3):325-34. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2006.04.008>.
- Raya-González, J., López-Bucio, J.S., Prado-Rodríguez, J.C., Ruiz-Herrera, L.F., Guevara-García, A.A. y López-Bucio, J. 2017. «The MEDIATOR genes MED12 and MED13 control Arabidopsis root system configuration influencing sugar and auxin responses». *Plant Molecular Biology* 95 (1-2):141-56. <https://doi.org/10.1007/s11103-017-0647-z>.
- Reed, J.W., Nagatani, A., Elich, T.D., Fagan, M. y Chory, J. 1994. «Phytochrome A and Phytochrome B Have Overlapping but Distinct Functions in Arabidopsis Development.» *Plant physiology* 104 (4):1139-49. [https://doi.org/10.1007/104/4/1139\[pil\]](https://doi.org/10.1007/104/4/1139[pil]).
- Reed, J.W., Nagpal, P., Poole, D.S., Furuya, M. y Chory, J. 1993. «Mutations in the gene for the red/far-red light receptor phytochrome B alter cell elongation and

- physiological responses throughout Arabidopsis development.» *The Plant cell* 5 (2):147-57. <https://doi.org/10.1105/tpc.5.2.147>.
- Reichler, S.A., Balk, J., Brown, M.E., Woodruff, K., Clark, G.B. y Roux, S.J. 2001. «Light Differentially Regulates Cell Division and the mRNA Abundance of Pea Nucleolin during De-Etiolation». *Plant physiology* 125:339-50. <https://doi.org/10.1104/pp.125.1.339>
- Reichow, S.L., Hamma, T., Ferré-D'Amaré, A.R. y Varani, G. 2007. «The structure and function of small nucleolar ribonucleoproteins». *Nucleic Acids Research* 35 (5):1452-64. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl1172>.
- Ren, M., Venglat, P., Qiu, S., Feng, L., Cao, Y., Wang, E., Xiang, D., Wang, J., Alexander, D., Chalivendra, S., Logan, D., Mattoo, A., Selvaraj, G. y Datla, R. 2012. «Target of Rapamycin Signaling Regulates Metabolism, Growth, and Life Span in Arabidopsis». *The Plant Cell* 24 (12):4850-74. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.107144>.
- Renaudin, J.P., Doonan, J.H., Freeman, D., Hashimoto, J., Hirt, H., Inzé, D., Jacobs, T., Kouchi, H., Rouz, P., Sauter, M., Saviour, A., Sorrell, D.A., Sundaresan, V. y Murray, J.A.H. 1996. «Plant cyclins: a unified nomenclature for plant A-, B- and D-type cyclins based on sequence organization.» *Plant molecular biology* 32 (6):1003-18. <https://doi.org/10.1007/BF00041384>.
- Riou-Khamlichi, C., Menges, M., Healy, J.M.S. y Murray, J.A.H. 2000. «Sugar control of the plant cell cycle: differential regulation of Arabidopsis D-type cyclin gene expression.» *Molecular and cellular biology* 20 (13):4513-21. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.13.4513-4521.2000>.
- Rockwell, N.C. 2006a. «The Structure of Phytochrome: A Picture Is Worth a Thousand Spectra». *the Plant Cell Online* 18 (1):4-14. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.038513>.
- Rockwell, N.C., Su, Y.S. y Lagarias, J.C. 2006b. «PHYTOCHROME STRUCTURE AND SIGNALING MECHANISMS». *Annual Review of Plant Biology* 57 (1):837-58. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144208>.
- Roger, B., Moisand, A., Amalric, F. y Bouvet. 2003. «Nucleolin provides a link between RNA polymerase I transcription and pre-ribosome assembly.» *Chromosoma* 111 (6):399-407. <https://doi.org/10.1007/s00412-002-0221-5>.
- Roman, G., Lubarsky, B., Kieber, J.J., Rothenberg, M. y Ecker, J.R. 1995. «Genetic analysis of ethylene signal transduction in Arabidopsis thaliana: Five novel mutant loci integrated into a stress response pathway». *Genetics* 139 (3):1393-1409.
- Rosso, M.G., Li, Y., Strizhov, N., Reiss, B., Dekker, K. y Weisshaar, B. 2003. «An Arabidopsis thaliana T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics». *Plant Molecular Biology* 53 (1-2):247-59. <https://doi.org/10.1023/B:PLAN.0000009297.37235.4a>.
- Rubery, P.H. y Sheldrake, A.R. 1973a. «The Polar Transport of Auxin». *Nature New Biology* (244):285-88. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.28.060177.002255>.
- Rubery, P.H. y Sheldrake, A.R. 1973b. «Effect of pH and Surface Charge on Cell Uptake of Auxin». *Nature New Biology* (244):285. <http://dx.doi.org/10.1038/newbio244285a0>.
- Rubery, P.H. y Sheldrake, A.R. 1974. «Carrier-mediated auxin transport». *Planta* 118 (2):101-21. <https://doi.org/10.1007/BF00388387>.
- Ruegger, M., Dewey, E., Gray, W.M., Hobbie, L., Turner, J. y Estelle, M. 1998. «The TIR1 protein of Arabidopsis functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast Grr1p». *Genes and Development* 12 (2):198-207. <https://doi.org/10.1101/gad.12.2.198>.

- Sablowski, R. y Dornelas, M.C. 2014. «Interplay between cell growth and cell cycle in plants». *Journal of Experimental Botany* 65 (10):2703-14. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert354>.
- Sáez-Vasquez, J. Caparros-Ruiz, D., Barneche, F. y Echeverría, M. 2004. «A plant snoRNP complex containing snoRNAs, fibrillarin, and nucleolin-like proteins is competent for both rRNA gene binding and pre-rRNA processing in vitro.» *Molecular and Cellular Biology* 24 (16):7284-97. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.16.7284-7297.2004>.
- Sáez-Vásquez, J. y Medina, F.J. 2008. «The Plant Nucleolus». *Advances in Botanical Research* 47 (08):1-46. [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(08\)00001-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(08)00001-3).
- Saito, C., Morita, M.T., Kato, T. y Tasaka, M. 2005. «Amyloplasts and vacuolar membrane dynamics in the living graviperceptive cell of the Arabidopsis inflorescence stem.» *The Plant cell* 17 (2):548-58. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.026138>.
- Sakai, T., Kagawa, T., Kasahara, M., Swartz, T.E., Christie, J.M., Briggs, W.R., Wada, M. y Okada, K. 2001. «Arabidopsis nph1 and npl1: Blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (12):6969-74. <https://doi.org/10.1073/pnas.101137598>.
- Sakamoto, K. y Briggs, W.R. 2002. «Cellular and Subcellular Localization of Phototropin 1». *the Plant Cell Online* 14 (8):1723-35. <https://doi.org/10.1105/tpc.003293>.
- Salinas, P., Bantignies, B., Tapia, J., Jordana, X. y Holuigue, L. 2001. «Cloning and characterization of the cDNA coding for the catalytic  $\alpha$  subunit of CK2 from tobacco». *Molecular and Cellular Biochemistry* 227 (1-2):129-35. <https://doi.org/10.1023/A:1013193730116>.
- Salinas, P., Fuentes, D., Vidal, E., Jordana, X., Echeverría, M. y Holuigue, L. 2006. «An extensive survey of CK2  $\alpha$  and  $\beta$  subunits in Arabidopsis: Multiple isoforms exhibit differential subcellular localization». *Plant and Cell Physiology* 47 (9):1295-1308. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcj100>.
- Scheres, B., Benfey, P. y Dolan, L. 2002. «Root Development». *The Arabidopsis Book* 40 (1):1-18. <https://doi.org/10.1199/tab.0101>.
- Schnittger, A., Weinl, C., Bouyer, D., Schobinger, U. y Hulskamp, M. 2003. «Misexpression of the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor ICK1/KRP1 in Single-Celled Arabidopsis Trichomes Reduces Endoreduplication and Cell Size and Induces Cell Death». *the Plant Cell Online* 15 (2):303-15. <https://doi.org/10.1105/tpc.008342>.
- Serges, G., Gadisseur, I., Bergounious, C., de Almeida Engler, J., Jacqumard, A., van Marc, M. y Inze, D. 1996. «The Arabidopsis cyclin-dependent kinase gene cdc2bAt is preferentially expressed during S and G2 phases of the cell cycle». *Th Plant Journal* 10 (4):601-12. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1996.10040601.x>
- Serin, G., Joseph, G., Faucher, C., Ghisolfi, L., Bouche, G., Amalric, F. y Bouvet, P. 1996. «Localization of nucleolin binding sites on human and mouse pre-ribosomal RNA». *Biochimie* 78 (6):530-38. [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(96\)84759-6](https://doi.org/10.1016/0300-9084(96)84759-6).
- Sherson, S.M., Alford, H.L., Forbes, S.M., Wallace, G. y Smith, S.M. 2003. «Roles of cell-wall invertases and monosaccharide transporters in the growth and development of Arabidopsis». *Journal of Experimental Botany* 54 (382):525-31. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg055>.
- Soga, K., Wakabayashi, K., Hoson, T. y Kamisaka, S. 2001. «Gravitational force regulates elongation growth of arabidopsis hypocotyls by modifying xyloglucan metabolism». *Advances in Space Research* 27 (5):1011-16. [https://doi.org/10.1016/S0273-1177\(01\)00176-4](https://doi.org/10.1016/S0273-1177(01)00176-4).
- Sorrell, D.A., Menges, M., Healy, J.M.S., Deveaux, Y., Amano, C., Su, Y., Nakagami, H.,

- Shinmyo, A., Doonan, J.H., Sekine, M. y Murray, J.A.H. 2001. «Cell cycle regulation of cyclin-dependent kinases in tobacco cultivar Bright Yellow-2 cells.» *Plant physiology* 126 (3):1214-23. <https://doi.org/10.1104/pp.126.3.1214>.
- Sorrell, D.A., Marchbank, A., McMahon, K., Dickinson, J.R., Rogers, H.J. y Francis, D. 2002. «A WEE1 homologue from *Arabidopsis thaliana*». *Planta* 215 (3):518-22. <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0815-4>.
- Sozzani, R., Maggio, C., Varotto, S., Canova, S., Bergounioux, C., Albani, D. y Cella, R. 2006. «Interplay between *Arabidopsis* Activating Factors E2Fb and E2Fa in Cell Cycle Progression and Development». *Plant Physiology* 140 (4):1355-66. <https://doi.org/10.1104/pp.106.077990>.
- Sparrow, A.H. 1963. «RELATIONSHIP BETWEEN CHROMOSOME VOLUME AND RADIATION SENSITIVITY IN PLANT CELLS». United States. <https://www.osti.gov/servlets/purl/4051183>.
- Stanek, D., Kiss, T. y Raska, I. 2000. «Pre-ribosomal RNA is processed in permeabilised cells at the site of transcription.» *European Journal of Cell Biology* 79 (3):202-7.
- Staves, M.P. 1997. «Cytoplasmic streaming and gravity sensing in *Chara* internodal cells». *Planta* 203. Springer:S79-84. <http://www.jstor.org/stable/23385100>.
- Stockert, J.C y Ondina, D. Colman. 1974. «Observations on Nucleolar Staining with Osmium Tetroxide». *Experientia* 103 (1970):751-52.
- Sugano, S., Andronis, C., Ong, M.S., Green, R.M. y Tobin, E.M. 1999. «The protein kinase CK2 is involved in regulation of circadian rhythms in *Arabidopsis*». *PNAS* (22):12362-12366. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.22.12362>
- Swarup, R., Marchant, A., Ljung, K., Sandberg, G., Palme, K. y Bennett, M. 2001. «Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the *Arabidopsis* root apex». *Genes & Development* (15):2648-53. <https://doi.org/10.1101/gad.210501.2648>.
- Taliansky, M.E., Brown, J.W.S., Rajamäki, M.L., Valkonen, J.P.T. y Kalinina, N.O. 2010. «Chapter 5 - Involvement of the Plant Nucleolus in Virus and Viroid Infections: Parallels with Animal Pathosystems». *Advances in Virus Research* (77):119-58. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385034-8.00005-3>.
- Teale, W.D., Paponov, I. y Palme, K. 2006. «Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development.» *Nature reviews. Molecular cell biology* 7 (11):847-59. <https://doi.org/10.1038/nrm2020>.
- Tepperman, James M., Tong Zhu, Hur-Song Chang, Xun Wang, y Peter H. Quail. 2001. «Multiple transcription-factor genes are early targets of phytochrome A signaling». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (16):9437-42. <https://doi.org/10.1073/pnas.161300998>.
- Tepperman, J.M., Hudson, M.E., Khanna, R., Zhu, T., Chang, S.H., Wang, X. y Quail, P.H. 2004. «Expression profiling of phyB mutant demonstrates substantial contribution of other phytochromes to red-light-regulated gene expression during seedling de-etiolation». *Plant Journal* 38 (5):725-39. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02084.x>.
- Testillano, P.S., Sanchez-Pina, M.A., Olmedilla, A., Ollacarizqueta, M.M., Tandler, C.J. y Risueño, M.C. 1991. «A specific Ultrastructural Method to Reveal DNA: The NAMA-Ur'»: *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 39 (10):1427-38.
- Testillano, P.S., González-Melendi, P., Ahmadian, P. y Risueño, M.C. 1995. «The methylation acetylation method: An ultrastructural cytochemistry for nucleic acids compatible with immunogold studies». *Journal of Structural Biology* (114):123-139. <https://doi.org/10.1006/jsbi.1995.1012>.

- Tong, C.G., Reichler, S., Blumenthal, S., Balk, J., Hsieh, H.L. y Roux, S.J. 1997. «Light regulation of the abundance of mRNA encoding a nucleolin-like protein localized in the nucleoli of pea nuclei». *Plant Physiol* 114 (2):643-52.  
<https://doi.org/10.1104/pp.114.2.643>.
- Trapnell, C., Williams, B.A., Pertea, G., Mortazavi, A., Kwan, G., Van Baren, M.J., Salzberg, S.L., Wold, B.J. y Pachter, L. 2010. «Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation». *Nature Biotechnology* 28 (5):511-15.  
<https://doi.org/10.1038/nbt.1621>.
- Ueda, J., Miyamoto, K., Uheda, E., Oka, M., Yano, S., Higashibata, A. y Ishioka, N. 2014. «Close relationships between polar auxin transport and graviresponse in plants». *Plant Biology* (16):43-49. <https://doi.org/10.1111/plb.12101>.
- Umeda, M., Bhalerao, R.P., Schell, J., Uchimiya, H. y Koncz, C. 1998. «A distinct cyclin-dependent kinase-activating kinase of Arabidopsis thaliana». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (9):5021-26.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.95.9.5021>.
- Valbuena, M.A., Manzano, A., Vandenbrink, J.P., Pereda-Loth, V., Carnero-Diaz, E., Edelmann, R.E., Kiss, J.Z., Herranz, R. y Medina, F.J. 2018. «The combined effects of real or simulated microgravity and red-light photoactivation on plant root meristematic cells». *Planta*, n.º 0123456789:1-14.  
<https://doi.org/10.1007/s00425-018-2930-x>.
- Vandenbrink, J.P., Brown, E.A., Harmer, S.L. y Blackman, B.K. 2014a. «Plant Science Turning heads : The biology of solar tracking in sunflower». *Plant Science* (224):20-26. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.04.006>.
- Vandenbrink, J.P. y Kiss, J.Z. 2015. «Space, the final frontier: A critical review of recent experiments performed in microgravity». *Plant Science*. (243):115-119.  
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.11.004>.
- Vandenbrink, J.P., Kiss, J.Z., Herranz, R. y Medina, F.J. 2014b. «Light and gravity signals synergize in modulating plant development». *Frontiers in Plant Science* (5):1-18.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00563>.
- Vandenbrink, J.P. y Kiss, J.Z. 2016. «Spaceflight Procedures and Operations Utilized During the Seedling Growth Experiments». *Gravitational and Space Research* 4 (2).
- Vandenhove, H., Vanhoudt, N., Cuypers, A., van Hees, M., Wannijn, J. y Horemans, N. 2010. «Life-cycle chronic gamma exposure of Arabidopsis thaliana induces growth effects but no discernable effects on oxidative stress pathways». *Plant Physiology and Biochemistry* 48 (9):778-86. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.06.006>.
- Vandepoele, K., Raes, J., De Veylder, L., Rouze, P., Rombauts, S. y Inze, D. 2002. «Genome-wide analysis of core cell cycle genes in Arabidopsis». *Plant Cell* 14 (4):903-16.  
<https://doi.org/10.1105/tpc.010445.primary>.
- Vandepoele, K., Vlieghe, K., Florquin, K., Hennig, L., Beemster, G.T.S., Gruissem, W., Van de Peer, Y., Inzé, D. y De Veylder, L. 2005. «Genome-wide identification of potential plant E2F target genes». *Plant Physiology* 139 (1):316-28.  
<https://doi.org/10.1104/pp.105.066290.316>.
- Vanhoudt, N., Horemans, N., Wannijn, J., Nauts, R., Van Hees, M. y Vandenhove, H. 2014. «Primary stress responses in Arabidopsis thaliana exposed to gamma radiation». *Journal of Environmental Radioactivity* (129):1-6.  
<https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2013.11.011>.
- Veith, T., Martin, R., Wurm, J.P., Weis, B.L., Duchardt-Ferner, E., Safferthal, C., Hennig, R., Mirus, O., Bohnsack, M.T., Wöhnert, J. y Schleiff, E. 2012. «Structural and functional

- analysis of the archaeal endonuclease Nob1». *Nucleic Acids Research* 40 (7):3259-74. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1186>.
- De Veylder, L., Beeckman, T., Beemster, G.T.S., Krols, L., Terras, F., Landrieu, I., van der Schueren, E., Maes, S., Naudts, M. y Inze, D. 2001. «Functional analysis of cyclin-dependent kinase inhibitors of Arabidopsis». *Plant Cell* 13 (7):1653-68. <https://doi.org/10.1105/tpc.13.7.1653>.
- De Veylder, L., Beeckman, T., Beemster, G.T.S., De Almeida Engler, J., Ormenese, S., Maes, S., Naudts, M., Van Der Schueren, E., Jacqumard, A., Engler, G. y Inze, D. 2002. «Control of proliferation, endoreduplication and differentiation by the Arabidopsis E2Fa-DPa transcription factor». *EMBO Journal* 21 (6):1360-68. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.6.1360>.
- De Veylder, L., Beeckman, T. y Inzé, D. 2007. «The ins and outs of the plant cell cycle». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8 (8):655-65. <https://doi.org/10.1038/nrm2227>.
- De Veylder, L., Joubès, J. y Inzé, D. 2003. «Plant cell cycle transitions». *Current Opinion in Plant Biology* 6 (6):536-43. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2003.09.001>.
- Vitha, S., Zhao, L. y Sack, F.D. 2000. «Interaction of Root Gravitropism and Phototropism in Arabidopsis Wild-Type and Starchless Mutants». *Plant Physiology* 122 (2):453-62. <https://doi.org/10.1104/pp.122.2.453>.
- Wan, Y.L., Eisinger, W., Ehrhardt, D., Kubitscheck, U., Baluska, F. y Briggs, W. 2008. «The subcellular localization and blue-light-induced movement of phototropin 1-GFP in etiolated seedlings of Arabidopsis thaliana». *Molecular Plant* 1 (1):103-17. <https://doi.org/10.1093/mp/ssm011>.
- Wang, B., Bailly, A., Zwiewka, M., Henrichs, S., Azzarello, E., Mancuso, S., Maeshima, M., Friml, J., Schulz, A. y Geisler, M. 2013. «Arabidopsis TWISTED DWARF1 Functionally Interacts with Auxin Exporter ABCB1 on the Root Plasma Membrane». *The Plant Cell* 25 (1):202-14. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.105999>.
- Wang, G., Kong, H., Sun, Y., Zhang, X., Zhang, W., Altman, N., Claude, W. y Ma, H. 2004. «Genome-Wide Analysis of the Cyclin Family in Arabidopsis and Comparative Phylogenetic Analysis of Plant Cyclin-Like Proteins 1 [ w ]». *Plant Physiology* (135):1084-99. <https://doi.org/10.1104/pp.104.040436.et>.
- Wang, H., Boisvert, D., Kim, K.K., Kim, R. y Kim, S.H. 2000. «Crystal structure of a fibrillarin homologue from <em>Methanococcus jannaschii</em>, a hyperthermophile, at 1.6 Å resolution». *The EMBO Journal* 19 (3):317 LP-323. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.3.317>.
- Wang, T., Sun, Q., Xu, W., Li, F., Li, H., Lu, J., Wu, L., Wu, Y., Liu, M. y Bian, P. 2015. «Modulation of modeled microgravity on radiation-induced bystander effects in Arabidopsis thaliana». *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* (773):27-36. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2015.01.010>.
- Warnasooriya, S.N. y Montgomery, B.L. 2011. «Spatial-specific regulation of root developmente by phytochromes in Arabidopsis thaliana», 6 (12):2047-50. <https://doi.org/10.4161/psb.6.12.18267>.
- Wayne, R. y Staves, M.P. 1996. «A down to earth model of gravisensing or Newton's Law of Gravitation from the apple's perspective». *Physiologia Plantarum* 98 (4). Wiley/Blackwell (10.1111):917-21. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1996.tb06703.x>.
- Wayne, R., Staves, M.P. y Leopold, A.C. 1990. «Gravity-dependent polarity of cytoplasmic streaming in Nitellopsis». *Protoplasma* (155):43-57.
- Wayne, R., Staves, M.P. y Leopold, A.C. 1992. «The contribution of the extracellular

- matrix to gravisensing in characean cells.» *Journal of cell science* 101 (3):611-23.
- Weis, B.L., Kovacevic, J., Missbach, S. y Schleiff, E. 2015a. «Plant-Specific Features of Ribosome Biogenesis». *Trends in Plant Science* 20 (11):729-40.  
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.07.003>.
- Weis, B.L., Palm, D., Missbach, S., Bohnsack, M.T. y Schleiff, E. 2015b. «atBRX1-1 and atBRX1-2 are involved in an alternative rRNA processing pathway in *Arabidopsis thaliana*.» *RNA (New York, N.Y.)* 21 (3):415-25.  
<https://doi.org/10.1261/rna.047563.114>.
- Went, F.W. y Thimann, V. 1937. «Phytohormones». *Botanical Gazette* 99 (1). The University of Chicago Press:207-8. <https://doi.org/10.1086/334699>.
- Wolverton, C. y Kiss, J.Z. 2009. «An Update on Plant Space Biology». *Gravitational and Space Biology* 22 (2):13-20.
- Woodward, A.W. y Bartel, B. 2005. «Auxin: Regulation, action, and interaction». *Annals of Botany* 95 (5):707-35. <https://doi.org/10.1093/aob/mci083>.
- Xi, L., Moscou, M.J., Meng, Y., Xu, W., Caldo, R.A., Shaver, M., Nettleton, D. y Wise, R.P. 2009. «Transcript-Based Cloning of RRP46, a Regulator of rRNA Processing and R Gene-Independent Cell Death in Barley-Powdery Mildew Interactions». *The Plant Cell* 21 (10):3280-95. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.066167>.
- Xiong, Y., McCormack, M., Li, L., Hall, Q., Xiang, C. y Sheen, J. 2013. «Glucose-TOR signalling reprograms the transcriptome and activates meristems». *Nature* 496 (7444). Nature Publishing Group:181-86. <https://doi.org/10.1038/nature12030>.
- Yu, X., Liu, H., Klejnot, J. y Lin, C. 2010. «The Cryptochrome Blue Light Receptors». *The Arabidopsis Book* 8:e0135. <https://doi.org/10.1199/tab.0135>.
- Yu, X., Shalitin, D., Liu, X., Maymon, M., Klejnot, J., Yang, H., Lopez, J., Zhao, X., Bendehakalu, K.T. y Lin, C. 2007. «Derepression of the NC80 motif is critical for the photoactivation of *Arabidopsis* CRY2.» *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (17):7289-94.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0701912104>.
- Zakrzewska-Placzek, M., Souret, F.F., Sobczyk, G.J., Green, P.J. y Kufel, J. 2010. «*Arabidopsis thaliana* XRN2 is required for primary cleavage in the pre-ribosomal RNA». *Nucleic Acids Research* 38 (13):4487-4502.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkq172>.